



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la toxocariosis humana

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Roberto Antonio ROJAS ARCA

ASESOR

Irma Adalberto ESPINOZA BLANCO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rojas R. Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la toxocariosis humana [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2019.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	“—”
DNI o pasaporte del autor	72188387
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-2858-7101
DNI o pasaporte del asesor	08724910
Grupo de investigación	“—”
Agencia financiadora	Autofinanciado
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, UNMSM, Lima, Perú.
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2017-20218
Disciplinas OCDE	https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.09



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica



"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN E IMPUNIDAD"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Blga. Alina Floralia Huiza Franco
Miembros: Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros
Lic. Giuliana Mercedes Romero Barrenechea
Asesora : Blga. Irma Adalberto Espinoza Blanco

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 16 de agosto del 2019, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"ESTANDARIZACIÓN DE UNA DOT-ELISA Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS HUMANA"**, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Señor:

ROBERTO ANTONIO ROJAS ARCA

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....14.....
(En números)

.....CATORCE.....
(En letras)

Que corresponde a la mención de:BUENO.....

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
Presidente
Blga. Alina Floralia Huiza Franco



.....
Miembro
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros

.....
Miembro
Lic. Giuliana Mercedes Romero Barrenechea

.....
Asesora de Tesis
Blga. Irma Adalberto Espinoza Blanco

**ESTANDARIZACIÓN DE UN DOT-ELISA Y DETECCIÓN
DE ANTICUERPOS IgE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
TOXOCARIOSIS HUMANA**

AUTOR

BACHILLER ROJAS ARCA, ROBERTO ANTONIO

ASESORA

BLGO. IRMA ADALBERTA ESPINOZA BLANCO

CO-ASESORES

MG. WILLIAM HENRY ROLDAN GONZALES

MED.I. PEDRO ERNESTO HUAPAYA HERREROS

DEDICATORIA

A mis padres, por todo su apoyo, cariño y sacrificio
que me han brindado en esta etapa de mi vida;
sus esfuerzos han sido bien aprovechados.

AGRADECIMIENTO

A la Prof. Blgo. Irma Espinoza Blanco de la sección científica de parasitología, por su amistad, confianza y enseñanzas como Asesora durante el proceso de este trabajo, muy agradecido por la oportunidad de seguir aprendiendo y mejorando.

Al Med. I. Pedro Huapaya Herreros, Prof. Mg. William Roldan Gonzales, por su amistad, confianza y enseñanzas como Co-Asesores durante el proceso de este trabajo, muy agradecido por la oportunidad de seguir aprendiendo y mejorando.

A la Tec. Lab. Susana Jiménez de la Sección Científica de Parasitología, por su amistad, confianza, apoyo y enseñanzas durante el proceso de este trabajo.

A la Directora del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, al igual que el personal que cordialmente me brindaron el acceso al instituto donde se realizó la Tesis.

A todos los profesores, colegas, compañeros, amigos, que me han brindado su confianza, conocimientos y me han acompañado durante el proceso de esta etapa.

ÍNDICE

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE GRÁFICOS	VIII
RESUMEN	IX
SUMMARY	XI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES	2
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.3. OBJETIVOS	6
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.4. BASES TEÓRICAS	6
1.4.1. BASE TEÓRICA	6
1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	26
1.4.3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	27
CAPÍTULO II: MÉTODOS.....	28
2.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	29
2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	29
2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
2.1.3. POBLACIÓN.....	30
2.1.4. MUESTRA	30
2.1.5. VARIABLES	30
2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS..	31

2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS	31
2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	32
2.2. DISEÑO PROCEDIMENTAL	32
2.2.1. PEGADO DEL ANTÍGENO	32
2.2.2. OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO	32
2.2.3. BUFFER DE DILUCIÓN	32
2.2.4. PREPARACIÓN DE LOS SUEROS	33
2.2.5. TIEMPO DE UNIÓN DEL ANTÍGENO-ANTICUERPO	33
2.2.6. OBTENCIÓN DEL CONJUGADO	33
2.2.7. SUSTRATO-CROMÓGENO	33
2.2.8. SOLUCION DE LAVADO	33
CAPÍTULO III: RESULTADOS	35
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	46
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
5.1. CONCLUSIONES	55
5.2. RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Relación de pruebas auxiliares y monitoreo del tratamiento.	14
Tabla N°2: Características en la diferenciación de las subclases de IgG	22
Tabla N°3: Tabla resumen de Isotipos de anticuerpos	25
Tabla N° 4: Número de resultados por cada parasitosis	41
Tabla N° 5: Cuadro de doble entrada para determinar valores predictivos	42
Tabla N° 6: Cuadro resumen del protocolo	43
Tabla N° 7: Tabla resumen de los valores de la prueba.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Figura N° 1: Formato de la composición de la tira del trabajo del grupo de Pappas ..	7
Figura N° 2: Detección de anticuerpos	9
Figura N° 3: Ciclo evolutivo de <i>Toxocara</i>	11
Figura N° 4: Fotografías de <i>Toxocara</i> adulto.....	12
Figura N° 5: Producción de anticuerpos por el linfocito B.....	18
Figura N°6: Formación de anticuerpos T Helper dependientes e independientes.	20
Figura N° 7: Resultado del conjugado diluido 1/500	38
Figura N° 8: Conjugados diluidos a otras concentraciones	39
Figura N° 9: Resumen de resultados.....	40
Figura N° 10: Gráfico de cantidad de muestras por parasitosis.....	44
Figura N° 11: Gráfico resumen de resultados de muestras positivas	45

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La Toxocariosis humana es una infección cosmopolita que está siendo estudiada en la actualidad por su impacto en la sociedad. Es ocasionada por la ingesta de alimentos contaminados con huevos larvados de segundo estadio de *Toxocara spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS: El trabajo es un estudio de tipo cualitativo, cuasi-experimental y prospectivo; la muestra estuvo conformada por un total de 200 sueros provenientes de la seroteca de la sección de investigación de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical - UNMSM: de personas diagnosticadas con diferentes parasitosis (n°=120), de personas en aparente buen estado de salud general - ABEG (n°=40) y de personas con diagnóstico confirmado a Toxocariosis (n°=40). El protocolo de ejecución consistió en estandarizar una prueba Dot-ELISA y detectar anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana mediante la determinación de los parámetros adecuados en la prueba para la detección de anticuerpos IgE como dilución, tiempo y concentraciones de las soluciones empleadas; determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba Dot-ELISA IgE, con el cálculo estadístico en un cuadro de doble entrada desarrollada en el programa Microsoft Excel; y la determinación de los valores predictivos positivos y negativos de la prueba Dot-ELISA IgE.

RESULTADOS: Según el estudio se determinó unos parámetros satisfactorios en la detección de anticuerpos IgE mediante una dilución del suero de 1/10 dils, dilución del conjugado de 1/500, una concentración del antígeno en 10 mg/dL, tiempo de reacción del antígeno-anticuerpo de 18 a 24 horas y un tiempo de reacción con el antígeno conjugado de 3 horas. Los valores de: sensibilidad: 97.5%, especificidad: 97.5%, valores predictivos; positivo: 90.69% y negativo: 99.36%, establecen que la prueba es confiable por los valores obtenidos, debido a su proximidad al 100%.

CONCLUSIÓN: Según el estudio, se concluye que la prueba es eficaz y de gran utilidad para determinar la presencia de los anticuerpos IgE y con ello información acerca de una infección activa con este parásito en poblaciones vulnerables, sobre todo en zonas de riesgo alto, como en poblaciones con bajos recursos socioeconómicos.

Palabras claves: Toxocariosis humana, *Toxocara*, Dot-ELISA, estandarización, antígeno TES, IgE.

SUMMARY

INTRODUCTION: Human Toxocariosis is a cosmopolitan infection that is currently being studied for its impact on society. It is caused by the ingestion of food contaminated with larval eggs from the second stage of *Toxocara spp.*

MATERIALS AND METHODS: The work is a qualitative, quasi-experimental and prospective study; the sample consisted of a total of 200 sera from the serology of the research section of Parasitology of the Institute of Tropical Medicine - UNMSM: of people diagnosed with different parasitosis ($n^{\circ} = 120$), of people in apparent good condition of general health - ABEG ($n^{\circ} = 40$) and of people with a confirmed diagnosis of Toxocariosis ($n^{\circ} = 40$). The execution protocol consisted of standardizing a Dot-ELISA test and detecting IgE antibodies for the diagnosis of human Toxocariosis by determining the appropriate parameters in the test for the detection of IgE antibodies such as dilution, time and concentrations of the solutions used; determination of the sensitivity and specificity of the Dot-ELISA IgE test, with the statistical calculation in a double-entry table developed in the Microsoft Excel program; and the determination of the positive and negative predictive values of the Dot-ELISA IgE test.

RESULTS: According to the study, satisfactory parameters in the detection of IgE antibodies were determined by a serum dilution of 1/10 dils, conjugate dilution of 1/500, a concentration of the antigen at 10 mg/dL, time for antigen-antibody reaction of 18 to 24 hours and a reaction time with the conjugated antigen of 3 hours. The sensibility: 97.5%, specificity: 97.5%, predictive values; positive: 90.69% and negative: 99.36%, establish that the test is reliable due for the obtained results, due to its proximity to 100%.

CONCLUSION: According to the study, it is concluded that the test is effective and very useful to determine the presence of IgE antibodies and with it information about an active infection with this parasite in vulnerable populations, especially in high-risk areas, as in populations with low socioeconomic resources.

Keywords: Human Toxocariosis, *Toxocara*, Dot-ELISA, Dot-Blot, standardization, antigen TES, IgE.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La Toxocariosis es una zoonosis parasitaria producida por la ingesta de huevos larvados de segundo estadio de *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, proveniente de las heces del perro y del gato respectivamente.⁽¹⁾

Es un problema epidemiológico a nivel mundial, relacionado a los perros y gatos, que pueden ser domésticos o callejeros; siendo estos focos de propagación mediante sus heces depositadas en los parques y/o juegos infantiles donde presenta la arena o tierra.⁽²⁾

Esta infección ha generado un gran impacto en el mundo. Siendo tema de investigación en diferentes países; en el continente americano: América del Sur, en países como Perú⁽³⁾, Brasil⁽⁴⁾, Argentina⁽⁵⁾ y en América del Norte se ha presentado estudios describiendo este problema.⁽⁶⁾ En el continente europeo se ha estudiado estas infecciones, en los países de: Bulgaria⁽⁷⁾, Bélgica⁽⁸⁾; en el continente asiático en el país de China⁽⁹⁾, entre otros.

El desarrollo de esta infección presentará dos posibles situaciones clínicas, donde la larva migrans involucrada será del tipo visceral u ocular (LMV y LMO respectivamente). En esta infección la sintomatología no es específica para aportar un diagnóstico certero, pero lo que puede ayudar a detectarlo en los casos más comunes es la eosinofilia, siendo uno de los signos más relacionados a esta parasitosis.⁽¹⁰⁾ Sin embargo hay casos escasos y raros donde puede presentarse de forma asintomática, como una Toxocariosis atípica.⁽¹¹⁾

Esta zoonosis no tiene una prueba precisa y exacta para realizar el diagnóstico: la biopsia, además de ser una técnica invasiva, no detecta en muchos casos al parásito y no siempre es posible realizarla. Por otro lado, las técnicas serológicas, la obtención de la muestra es sencilla, permite la detección de anticuerpos específicos proporcionando información sobre la infección.⁽¹²⁾ Por estas razones es importante seguir con las investigaciones para aumentar las herramientas de diagnóstico para este problema.

Teniendo en cuenta la presencia de la eosinofilia en la Toxocariosis se plantea realizar la estandarización de una prueba serológica llamada Dot-ELISA para detectar anticuerpos IgE para la ayuda en el diagnóstico de la Toxocariosis humana. La detección de anticuerpos IgE, se ha estudiado anteriormente en las parasitosis donde los helmintos o histoparásitos son los principales causantes, como es en el caso del trabajo de investigación realizado en Perú por: Vildozola H. y cols (2012) sobre: “Estandarización de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgE en pacientes con equinococosis quística y su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes tratados con Albendazol: reporte preliminar.” Donde se busca determinar las diluciones y concentraciones óptimas de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgE, así como su sensibilidad, especificidad y valores predictivos en pacientes con equinococosis quística. Es un trabajo cuasi-experimental donde se usó cinco muestras de suero de pacientes con diagnóstico clínico de equinococosis quística y con serología positiva a hidatidosis, mediante las pruebas de ELISA y Western Blot (con bandas diagnosticas de 8, 16, 21 kDa), donde estos sueros ayudaron a determinar la sensibilidad de la prueba. Luego para establecer la especificidad se utilizó treinta sueros de personas aparentemente sanas y con serología negativa a hidatidosis. Para descartar las reacciones cruzadas se utilizó dieciséis muestras de suero de pacientes con otras helmintiasis.⁽¹³⁾ En la continuación del trabajo, luego de haber alcanzado la detección de la infección y siendo una alternativa económica, también les fue útil para el control del tratamiento: Vildozola H. y cols (2015), “Seguimiento mediante prueba de ELISA para anticuerpos IgE de pacientes con equinococosis quística tratados con Albendazol.” Una vez con la prueba estandarizada, se empezó a realizar el seguimiento de los pacientes con la presencia de quistes hidatídicos de diferentes tamaños y que habían comenzado con tratamiento con el Albendazol; tratamientos después de dos a doce años. Cada paciente presentó diferentes cantidades de anticuerpos al iniciar el tratamiento, luego utilizando la prueba se determinó que la cantidad de anticuerpos que se detectaron conforme se aplicaba el tratamiento habían disminuidos, con lo cual, la prueba resultó de mucha ayuda.⁽¹⁴⁾

La prueba de Dot-ELISA es muy versátil para diferentes campos de estudios, llegar a estandarizarla requiere de constancia y de conocimiento previo sobre el tema para alcanzar los valores apropiados en cada etapa del procedimiento, llegados a este punto de éxito se puede detectar diferentes microorganismos por medio de una muestra en estudio. Esto se ha comprobado en el trabajo de: Mika C. y cols (2017) con el trabajo: “Standardization and validation of Dot-ELISA assay for *Paracoccidioides brasiliensis* antibody detection.” (Estandarización y validación de un ensayo de Dot-Elisa para la detección del anticuerpo de *Paracoccidioides brasiliensis*). Donde se concentran en estandarizar y validar el ensayo de Dot-Elisa, comparándolo con serología estándar e inmunodifusión doble. En este trabajo el procedimiento del ensayo nos brinda conocimientos sobre su método.⁽¹⁵⁾ Además, para la detección de anticuerpos IgE también se puede realizar con antígenos específicos como en el caso de: Wang Y. y cols (2013), “Detection of immunoglobulin E using an aptamer based Dot-Blot assay.” Un aptámero anti IgE biotinizado se sintetizó artificialmente y luego pegado en las tiras de nitrocelulosa donde se enfrentó con una solución de IgE, se le agregó el conjugado IgE, la reacción de biotina-avidina permitió fortalecer la reacción, brindando mayor especificidad en la interacción de la IgE con su anti IgE. Por medio de la coloración presentada se puede determinar la presencia de IgE con una buena sensibilidad y especificidad, siendo una herramienta muy efectiva y de bajos costos como principal aporte.⁽¹⁶⁾

La Toxocariosis humana constituye un problema presente en la sociedad, por ello, se ha realizado este trabajo para su oportuna atención y al alcance económico de las personas. Teniendo en cuenta los antecedentes sobre esta prueba en diferentes campos de acción, es que nos preguntamos: ¿Es posible estandarizar un Dot-ELISA y detectar anticuerpos IgE para el diagnóstico de Toxocariosis humana?

1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La crianza de animales domésticos con escasa higiene y el mal lavado de las manos de las personas después de tocar a sus mascotas provoca que el riesgo de infectarse y presentar Toxocariosis sea alto. Afecta con mayor frecuencia a los niños, ya que ellos en esta etapa de aprendizaje y diversión por conocer el mundo que los rodea están más propensos a adquirir la infección. Se pueden contaminar por diferentes mecanismos: cuando están acariciando a los perros que presentan escasa higiene, o cuando los niños van a jugar a los parques, donde tanto los animales domésticos como callejeros defecan; debido a eso, no se percatan en qué momento adquieren esta infección.⁽¹⁾

La sintomatología varía en la población, por ello el poder reconocerla es de mucha dificultad en los centros de salud; en algunos casos la presencia de eosinofilia aporta al diagnóstico; no hay una prueba confirmatoria para este problema; las larvas migrans no son fáciles de detectar en los casos clínicos.⁽¹⁾

Debido a que este tipo de helmintiasis presenta una reacción alérgica guiada por el aumento de anticuerpos IgE (congruente con estudios previos sobre el incremento de anticuerpos IgE estudiados en animales experimentales, con la conclusión de la eosinofilia en la Toxocariosis)⁽¹⁷⁾, se busca que estos anticuerpos sean específicos, ya que, el paciente puede presentar reacciones alérgicas constantes debido a otras circunstancias, como sucedió en los casos descritos por el grupo de *Qualizza (2009)*: donde los casos ya son avanzados en las reacciones alérgicas en pacientes adultos infectados cuando eran menores de edad y el inicio de una reacción anafiláctica era congruente con alguna otra enfermedad.⁽¹⁸⁾

Con el presente estudio se trata de estandarizar una prueba Dot-ELISA capaz de detectar anticuerpos IgE específicos contra este parásito para brindar el diagnóstico oportuno al paciente sobre una infección activa, contribuir a su tratamiento, y a su vez brindarle al médico una herramienta de diagnóstico confiable y precisa.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar un Dot-ELISA y detectar anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los parámetros adecuados para la detección eficaz de anticuerpos IgE contra *Toxocara*.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba Dot-ELISA IgE.
- Determinar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba Dot-ELISA IgE.

1.4. BASES TEÓRICAS

1.4.1. BASE TEÓRICA

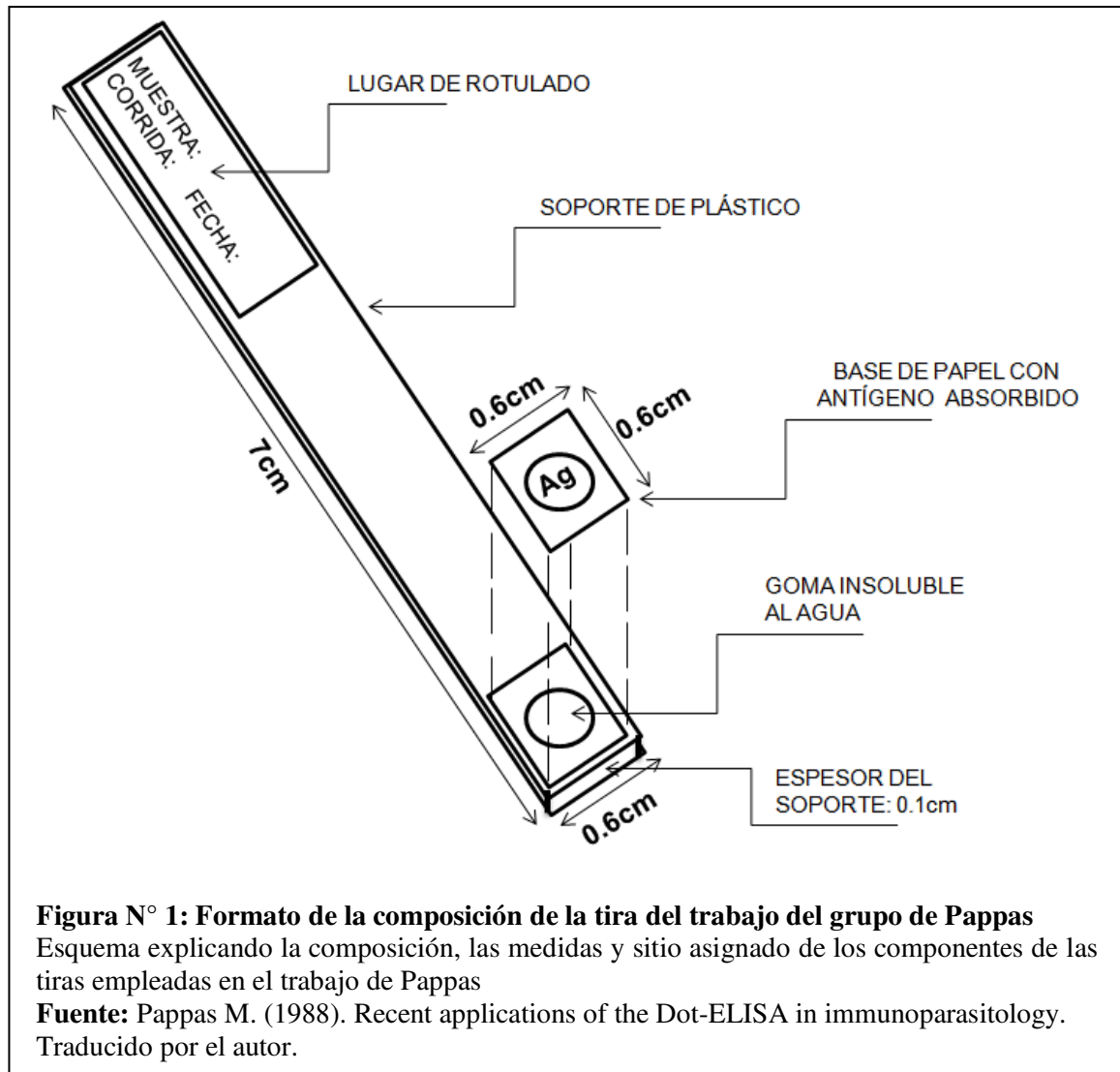
1.4.1.1. PRUEBA DE DOT-ELISA

La prueba de Dot-ELISA es una técnica derivada del ELISA convencional, siendo las diferencias con ésta, que no necesita equipos y personal especializado para poder desarrollarla. Estos factores la convierten en una herramienta de bajo costo y con un procesamiento no complejo.⁽¹⁹⁻²²⁾ Su utilidad ayuda en los trabajos de campo o zonas rurales, con poblaciones extensas, ya que no necesita de equipos especializados para su desarrollo.⁽²¹⁾ El almacenamiento de las tiras usadas en la prueba no ocupa demasiado espacio y no requiere de contenedores especiales. Los resultados se observan a simple vista y perduran con el tiempo sin presentar mucho desgaste.^(20,21)

Antecedentes

Esta prueba fue elaborada por Pappas en el año 1988, como una herramienta alterna al ELISA u otras técnicas usadas por la época, como la aglutinación en látex.⁽²²⁾ A partir de ese año en adelante el serodiagnóstico presentó una mejora para brindar

apoyo en el diagnóstico de diferentes problemas de la época como, por ejemplo: en el estudio de Malaria. ⁽²²⁾ Debido al desarrollo de nuevas investigaciones para la obtención de herramientas menos complejas, es que el diagnóstico es más práctico de abordar por el personal de salud. ^(19,20)



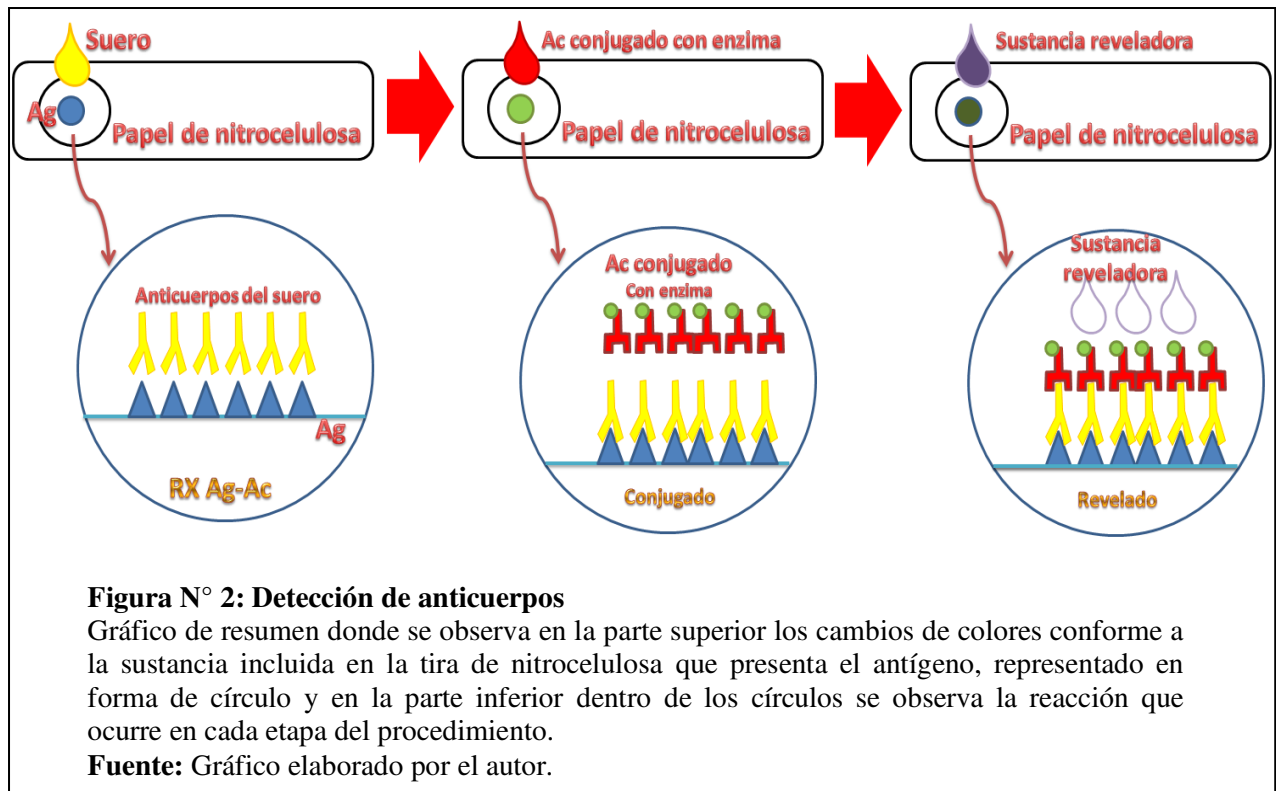
Metodología

Consiste en el pegado de antígenos solubles en una tira de nitrocelulosa o cualquiera otro material que presente las características de retención (por medio de una diferencia de cargas iónicas) de la sustancia incluida, la cual perdura por más tiempo almacenada o al obtener la reacción de color en los resultados. Una vez que se incluye la solución en la tira, esta se seca y luego se prosigue a bloquear las uniones

libres inespecíficas que hayan quedado, con lo cual, se evitará falsos positivos. Una vez realizado el proceso de bloqueo ya está listo para añadir el suero en estudio, se incubará a una temperatura específica y durante un tiempo determinado para que la unión del antígeno con el anticuerpo se realice correctamente, luego se añadirá un anti-anticuerpo específico que puede estar conjugado con una enzima (mayoría de los casos es la peroxidasa), en caso se use un anti-anticuerpo específico sin enzima, se incluirá luego un conjugado específico para ese anti-anticuerpo adicional. Por último, se le añade una solución reveladora que activará a la enzima, dejando un indicador de color, que nos permite saber si hay presencia de la reacción. ⁽¹⁹⁻²²⁾

Detección de anticuerpos

Esta prueba permite realizar la detección de anticuerpos por medio de la unión “in vitro” de un antígeno específico. Esta herramienta tan versátil puede detectar los anticuerpos de diferentes orígenes, siendo monoclonales o policlonales, dependiendo del antígeno que se use, es debido a eso que la vuelve una prueba eficiente para aportar en los diagnósticos de diferentes infecciones. ^(19,21) Los anticuerpos se encuentran en la muestra de suero recolectada del paciente. Por lo tanto, al unir estos dos elementos, junto a condiciones apropiadas, obtenemos la información de la infección presente en el organismo. ⁽¹⁹⁻²¹⁾



1.4.1.2. TOXOCARIOSIS

Enfermedad zoonótica producida por la ingesta de alimentos contaminados de forma accidental con heces de perros y de gatos que presentan la forma infectante del parásito conocido como *Toxocara spp.* Es un problema de salud a nivel mundial, con un mecanismo de infección silencioso, afecta principalmente a los niños; y cuya sintomatología se presenta en tiempos variables, pueden ser días, semanas o hasta años para manifestarse signos y síntomas. ^(23,24)

Agente causal

El agente causal de esta enfermedad es el helminto *Toxocara spp.*, ubicado en el intestino de perros y gatos. ^(23,24)

Ciclo evolutivo

El parásito *Toxocara* se puede transmitir de diferentes formas, siendo los hospederos definitivos los perros y gatos. Los huevos de estos parásitos ubicados en las heces de

estos animales pueden perdurar de tres semanas a más, en un ambiente húmedo y propicio para su mantenimiento.^(23,24)

En los animales:

Una de las formas de infección consiste en que los huevos larvados de segundo estadio ingresen oralmente al hospedero (siendo los afectados los cachorros de perros o gatos de 3 a 5 meses de edad), donde con la ayuda de los líquidos del estómago y del intestino delgado permiten que el huevo eclosione; la larva al momento de liberarse perfora las paredes del intestino, llegando a los vasos sanguíneos por donde se transporta a diferentes tejidos del organismo, especialmente hígado y pulmones, donde se transformará en larva de tercer y cuarto estadio (ciclo conocido como “Ciclo de Loos”). Luego seguirá su ciclo pasando por la tráquea hacia el estómago y posteriormente alojarse en el intestino delgado donde se desarrollará su forma adulta (forma definitiva).^(23,24)

Otro modo de infección es por vía parenteral o transplacentaria, donde la hembra preñada presenta la infección con el parásito; ocasionando que la larva encuentre otro camino llegando al saco vitelino donde contaminará al feto; al nacer, ya presentará la infección.^(23,24)

Un mecanismo de infección que se presenta en muy pocos casos es cuando el perro o el gato ingiere comida contaminada que contiene al parásito en estado quiescente, el animal al comerla activa al parásito, el cual evolucionará hasta su forma adulta.^(23,24)

En los humanos:

En el hombre la evolución del parásito es diferente; una vez que el ser humano ingiere sus alimentos contaminados con los huevos larvados de segundo estadio, estos eclosionarán en el intestino, la larva atravesará la pared intestinal, llegando a los vasos sanguíneos por donde se transportará hacia diferentes órganos o tejidos, donde el parásito permanecerá por un tiempo variable o indefinido. La larva en el ser humano no alcanzará su estadio adulto, por lo tanto, se mantendrá en la persona para su supervivencia. Esta larva se le nombra como larva migrans y tomará un nombre distinto según el órgano afectado donde permanecerá; por ejemplo; si la larva se

Adulto: Los adultos presentan una morfología similar al *Ascaris lumbricoides*, pero de menor tamaño. Tiene dimorfismo sexual (hembra y macho) y su hábitat es el intestino delgado de los perros y gatos. En el extremo anterior presentan aletas cefálicas alargadas. Las hembras tienen una longitud entre los 6.5 y 10 cm, en el útero pueden albergar hasta 27 millones de huevos al mismo tiempo. Los machos presentan una longitud de 4 a 6 cm.



Fotografía de adulto de *Toxocara*
(macho)



Fotografía de adulto de *Toxocara*
(hembra)

Figura N° 4: Fotografías de *Toxocara* adulto

Fotografías de *Toxocara* tanto macho como hembra respectivamente, donde se aprecia la diferente forma, grosor y tamaño de cada uno.

Fuente: Fotos tomadas por el autor

Sintomatología

La sintomatología provocada por este parásito depende del órgano afectado por la larva migrans. En la fase aguda, la infección suele pasar desapercibida y en algunos casos se presenta eosinofilia; en un trabajo descrito por el grupo de Roldán y cols encontraron un 40% de eosinofilia en personas positivas a Toxocariosis, siendo este porcentaje alto.⁽²⁷⁾ En una fase latente, la larva puede ocasionar inflamación local. En la fase crónica, la sintomatología variará dependiendo de los órganos afectados, siendo los de mayor frecuencia: hígado y pulmón; de menor frecuencia: cerebro; el proceso avanzado y severo de la infección se puede llevar a cabo en el ojo.^(23,24)

Con el caso de una LMV, en el hígado se puede generar: hepatomegalia, fiebre, dolor abdominal y también esplenomegalia. En los pulmones: disnea, tos, sibilancias, broncoespasmos, asma, neumonitis intersticial o hasta efusión pleural. En el cerebro

se presenta alteraciones diversas como: dolor de cabeza, fotofobia, agotamiento, confusión, dorsalgia, demencia y hasta depresión; en raros casos progresa hasta una meningitis eosinófila, encefalitis, mielitis y hasta convulsiones. Y en la piel: prurito, eccemas, urticaria y vasculitis. ^(23,24)

En la LMO, proceso más avanzado y severo de la infección, se presenta: uveítis, retinitis (por granulomas retinianas con o sin presencia de la larva), pequeñas hemorragias y abscesos eosinófilos. ⁽²³⁻²⁵⁾

Pruebas de diagnóstico

Cabe mencionar que el diagnóstico de esta enfermedad todavía es discutible, todavía no se cuenta con una prueba confirmatoria precisa.

Para una LMV, la biopsia es una técnica con un margen de error elevado en los órganos afectados (no en todas las biopsias se pueden encontrar la presencia del parásito). Y en una LMO, la observación de la larva sería diagnosticada por el médico oftalmólogo. De no encontrar al parásito, una prueba serológica aportaría a su identificación (como en el caso reportado por el equipo de Pak en el año 2016). ⁽²⁸⁾ Es por ello que, el estudio serológico se presenta como una herramienta oportuna de diagnóstico, además de los síntomas clínicos identificados en el paciente por el médico tratante. ⁽¹⁰⁾ Es también importante recalcar que la toma de muestra, para las pruebas serológicas, no es tan invasiva como la biopsia y alivia al paciente de posibles riesgos en su obtención.

Prueba auxiliar	Utilidad	Sensibilidad	Especificidad	Disponibilidad	Monitoreo del tratamiento
Diagnóstico por imagen ^a	+++	+++	-	Disponible	+++
Fondoscopia ^b	+++	+++	+	Disponible	+++
Eosinofilia	+++	++	-	Disponible	+++
Dosaje total de IgE	+++	++	-	Disponible	+++
ELISA-IgM	+	++	ND	Disponible	-
ELISA-IgG ^c	+++	+++	+++	Disponible	-
ELISA-IgG Avez	+++	+++	ND	Restringido ^e	-
ELISA-IgE	++	++	++	Restringido ^e	+++
Inmunoblot-IgG ^d	+++	+++	+++	Restringido ^e	-

(a) Ecografía, resonancia magnética y tomografía computarizada; (b) solo para casos oculares; (c) poco sensible en casos oculares; (d) prueba confirmatoria; (e) restringido a laboratorios de investigación.

+++ = Muy alto o muy importante

++ = Alto o importante

+ = Poco o aceptable

- = No útil o no importante

ND = No determinado

Tabla N° 1: Relación de pruebas auxiliares y monitoreo del tratamiento.

Tabla narrativa de las técnicas encontradas en la actualidad para el cuidado y monitoreo del tratamiento de la Toxocariosis humana, nos presenta las pruebas disponibles y restringidas hacia las personas. Nos proporciona que técnica estaría a la vanguardia para el aporte al diagnóstico, siendo la prueba de ELISA-IgG (Disponible) y el Inmuno Blot-IgG (restringido) las de mayor utilidad, sensibilidad y especificada, pero no acta para el monitoreo de la infección, a diferencia del diagnóstico por imagen, fondoscopia, eosinofilia, dosaje total de IgE y la técnica ELISA-IgE.

Fuente: Roldán W, et al. (2010). Diagnóstico de la Toxocariosis humana.

Tratamiento

Algunas personas por la acción del sistema inmune se liberan de esta infección, pero en otros casos requiere de fármacos para la eliminación del parásito. Siendo estos fármacos: como primera línea de tratamiento el Albendazole que se suministra en dosis de 400 mg al día, durante 5 a 10 días. Luego lo que se utiliza como segunda línea de tratamiento es el Mebendazole o Benzimidazole, que se administran en dosis de 100 mg por 3 a 5 días o hasta 21 días dependiendo de la infección. También como otra alternativa se suele utilizar el Thiabendazole en dosis de 25 mg al día por un periodo de 7 días.^(23,24)

En los casos de tratamientos sintomáticos alérgicos se le añade también el uso de corticoesteroides junto con las otras dosis de medicamentos para suprimir dichas manifestaciones alérgicas.^(23,24)

Epidemiología

La Toxocariosis humana es una zoonosis a nivel mundial. En América del Norte, Estados Unidos por el grupo de Lee realizaron un estudio en el año 2014 revisando publicaciones de forma retrospectiva (10 años atrás) en Estados Unidos, Canadá y México; observando que la prevalencia excedía el 10% para cada país, por lo que se consideró alta.⁽⁶⁾ Luego en los años 2009-2010 el grupo de Lum observó que los casos en Toxocariosis ocular fue significativo por presentar pérdida de visión permanente en el 68% de los casos reportados con problemas visuales por lo que se consideró un problema de salud alarmante.⁽²⁹⁾ En Perú, el estudio en el año 2016 realizado por Espinoza y cols, en la región de Lima se encontró una seroprevalencia del 32%, siendo alta.⁽³⁾

Los parques son un punto de acceso abierto al público y a sus mascotas; las heces de estos animales que no se recogen aumentan el riesgo de contagio para las personas.⁽²⁾ Otro punto de acceso público donde se ha podido encontrar la presencia de este parásito ha sido en instituciones educativas estatales, descrito por el equipo de Ramírez y cols en el año 2014 en distritos al Norte de Lima.⁽³⁰⁾

Una profesión que presenta mayor riesgo a infectarse descrito en un reporte en Perú son los veterinarios, ya que, presentan un contacto directo con el cuidado de estos animales.⁽³¹⁾

Mecanismo de prevención

La prevención para enfrentar este problema es el adecuado cuidado de las mascotas, en su higiene, vacunación y responsabilidad del propietario ante la sociedad (debido recojo de las heces de sus mascotas o evitando que hagan sus deposiciones en ambientes públicos como los parques); además de una cultura de higiene por parte de las personas (conocimiento del buen lavado de las manos) dentro del hogar o en la calle.^(32,33) Adicional a estas medidas la Organización Mundial de sanidad animal (OIE) recomienda que se presente un buen control sobre las poblaciones de perros vagabundos para disminuir las posibles infecciones causadas por estos animales y que los servicios veterinarios no se dejen de lado en ningún momento.⁽³⁴⁾

1.4.1.3. ANTÍGENO DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN

También conocido como TES (antígeno de secreción-excreción de *Toxocara*), es el antígeno producido por los desechos metabólicos de las larvas de *Toxocara*, que pueden presentarse en el organismo del hospedero o cuando se cultivan en medios especiales para su obtención.⁽³⁵⁻³⁷⁾ Estos antígenos en el órgano afectado suelen presentar manifestaciones clínicas en la persona; las técnicas serológicas utilizan esta sustancia como antígeno, por ser específico para el diagnóstico de la parasitosis.^(35,36)

Medios de cultivo

Medio RPMI 1680: Es un medio utilizado en primera instancia en hematología para realizar cultivos de células hematopoyéticas, relacionadas con el crecimiento de los leucocitos normales o neoplásicos. Dependiendo de los suplementos que se le pueden agregar, el uso puede llegar a ser diverso en el cultivo celular, por ello es utilizado para la obtención del antígeno de secreción-excreción, ya que, sus componentes enriquecen el medio, brindando un ambiente apropiado para el crecimiento de las

larvas de *Toxocara*. Algunos de los componentes base utilizados son: buffer bicarbonato, L-glutamina, L-leucina, L-lisina y L-methionina.⁽³⁸⁾

En un estudio realizado en Colombia en el año 2011 por el grupo de Marín, evaluó cuatro medios de cultivo para desarrollar la embriogénesis de *Toxocara* de manera más rápida y con menor contaminación del medio. Como resultado se observó que el uso del medio RPMI se debe de tener mucho cuidado, puesto que, se contamina con mayor facilidad; además el estudio arrojó que para obtener una mejor embriogénesis se puede utilizar agua estéril donde es más rápida y sin contaminación.⁽³⁹⁾

Metodología de obtención

Se procede a recolectar los parásitos adultos en el intestino de los cachorros, sacrificándolos o usando antihelmínticos que no destruyan los especímenes, como la piperazina. Los parásitos recolectados se limpian y se separa a las hembras en solución salina, con una disección de sus úteros se recolectará los huevos embrionados; estos serán incubados en un medio RPMI donde eclosionarán. Las larvas dejarán sus sustancias metabólicas en el cultivo, las cuales se recolectarán por centrifugación. Este antígeno es específico para detectar a la larva migrans al momento de realizar la prueba serológica.⁽³⁵⁻³⁷⁾

1.4.1.4. ANTICUERPOS CIRCULANTES

Los anticuerpos circulantes o también conocidos como inmunoglobulinas son una familia de glucoproteínas solubles específicos que reconocen antígenos (sustancias moleculares extrañas para el organismo). Estos anticuerpos forman parte de la inmunidad humoral como una respuesta inmunitaria adaptativa junto con los receptores para el antígeno de los linfocitos T y las moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC); siendo los anticuerpos las moléculas con un mayor espectro de respuesta ante la diversidad de los antígenos presentes en el medio que nos rodea.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Los anticuerpos se pueden encontrar de dos formas: unidos a la membrana en la superficie de los linfocitos B (los cuales ayuda para el reconocimiento de los antígenos) y secretados que están presentes en la circulación, los tejidos y las mucosas (los cuales neutralizan las toxinas, impiden la entrada, propagación y hasta la eliminación de los microorganismos patógenos).⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Los anticuerpos son sintetizados en los linfocitos B, siendo estas células las únicas capaces de esta función. Debido a que los anticuerpos están formando parte de la membrana de los linfocitos B, estos cumplen la función de receptores específicos de los antígenos y con ello contribuye a que el linfocito B se active y analice esa porción identificada, diferenciándose en células plasmáticas (plasmocitos) para la producción y secreción de una mayor cantidad de anticuerpos específicos para ese antígeno reconocido, brindando una mayor protección. Estas secreciones de anticuerpos se acumulan en el plasma, las secreciones mucosas y el líquido intersticial de los tejidos.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

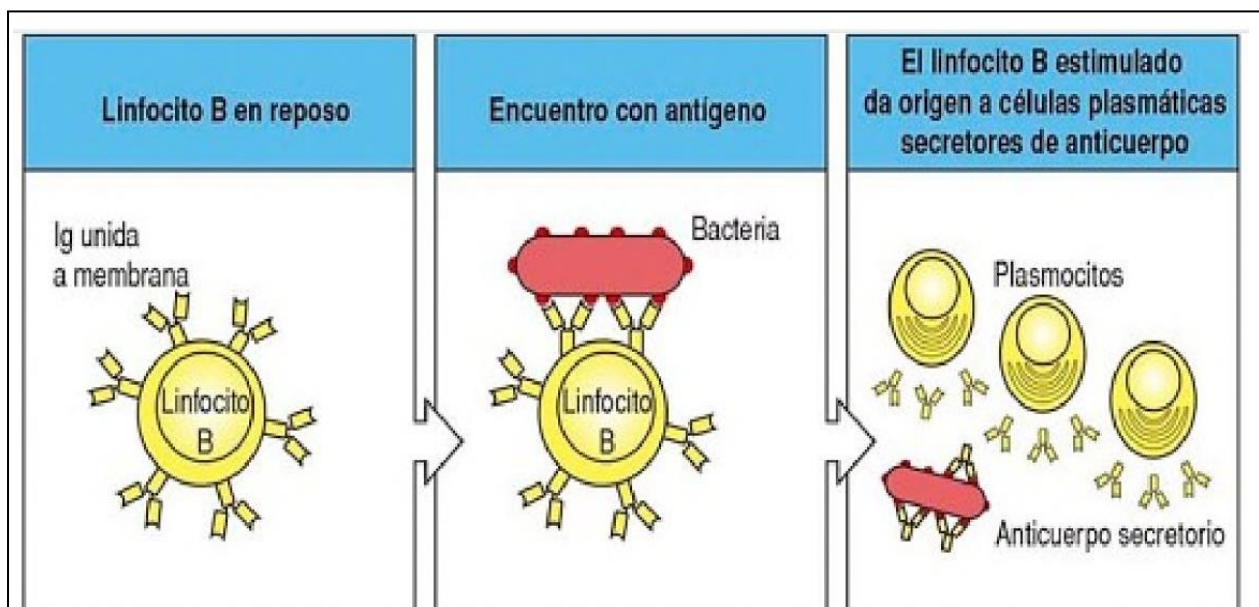


Figura N° 5: Producción de anticuerpos por el linfocito B

Esquema representativo acerca de la identificación de algún antígeno con el receptor de los linfocitos B, el cual se activará transformándose en plasmocito y ocasionará la producción de anticuerpos específicos contra ese antígeno

Fuente: Libro: Parhan P. (2016). The immune system.

Estructura del anticuerpo

Todas las moléculas de anticuerpos, llamadas también como globulinas gamma (por la porción que proporciona la inmunidad a esta molécula, ya que no todos los anticuerpos tienen movilidad electroforética gamma) o conocidas como inmunoglobulinas (Ig), comparten las mismas características estructurales básicas, de cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras). Al estar juntas estas cadenas, se puede diferenciar en regiones (una región variable o región Fab y una región constante o región Fc). La región Fab (fragment antigen binding o fragmento de unión antigénica) o región variable, es el lugar de unión a los antígenos, donde presenta una diferenciación en la región aminoterminal que hace específicos a los anticuerpos para distintos antígenos. En cambio, la región Fc (fragment crystallizable o fragmento cristalizante) o cuerpo del anticuerpo se encarga principalmente de funciones efectoras al unirse a las proteínas séricas y receptores superficiales celulares. ⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Además, aunque los anticuerpos presenten una estructura básica similar estas moléculas se van a diferenciar por el tamaño (está dado por el número de cadenas polipeptídicas), la carga, la secuencia de aminoácidos y el contenido de glúcidos que presenten cada uno de ellos. ⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Clases de anticuerpos

En el ser humano y en la mayoría de los mamíferos se ha encontrado cinco clases diferentes de moléculas de anticuerpos, los cuales se van a diferenciar en ciertos aspectos y cumplir distintas funciones en la ayuda de la respuesta inmune adaptativa. Estas moléculas de anticuerpos son: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE; las cuales han adquirido esta nomenclatura por una letra griega representativa colocada a sus cadenas pesadas.

En la producción de anticuerpos la participación de las células T facilita el proceso, de tal forma que se dividirán en dos grupos: si son dependientes de linfocitos T o no dependientes de linfocitos T. Estos linfocitos T que intervendrán en la formación de los anticuerpos circulantes son los linfocitos T Helper, los cuales reconocerán al antígeno y lo presentarán a las células B; esta es la mayor forma de producción de

anticuerpos de donde destacan las inmunoglobulinas G, E, A. Si no interviene el linfocito T Helper se producirá las inmunoglobulinas M. ⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

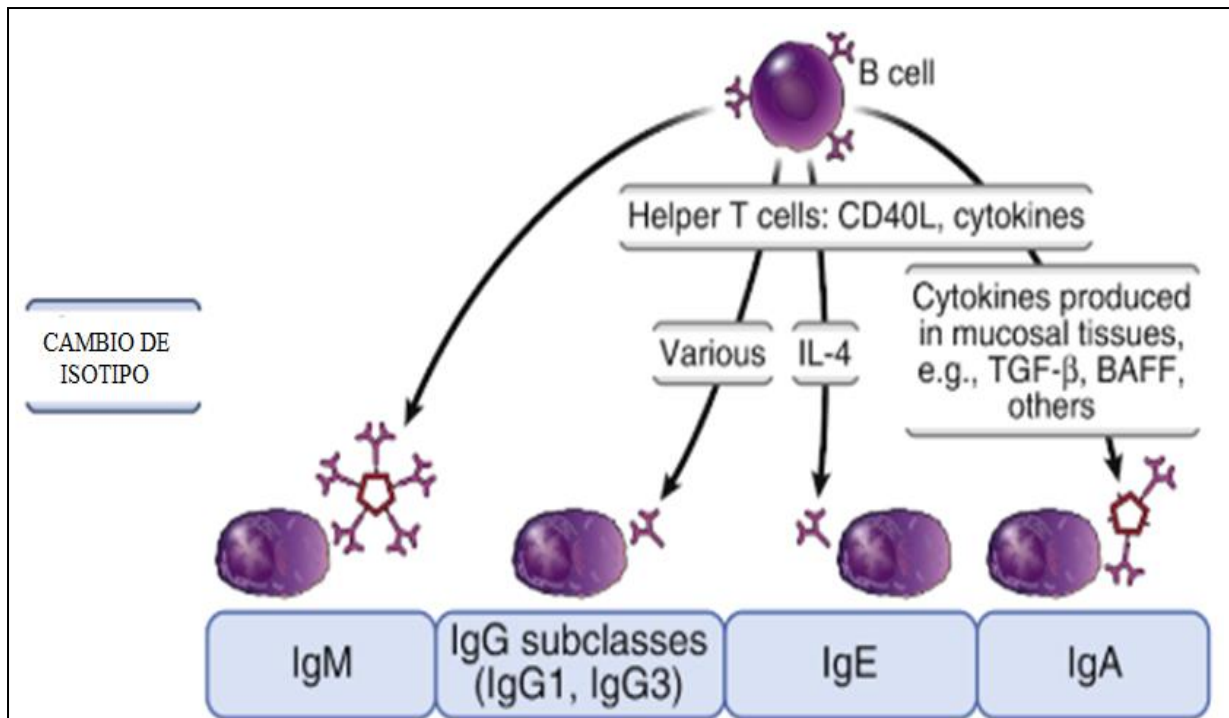


Figura N°6: Formación de anticuerpos T Helper dependientes e independientes.

Esquema donde se aprecia los anticuerpos producidos por el linfocito B de forma dependiente o independientemente por los linfocitos T Helper. Además de algunos componentes adicionales que intervienen, como las citoquinas.

Fuente: Libro: Abbas A y cols. (2019). Basic Immunology: Functions and Disorders of the immune system.

Inmunoglobulina M (IgM): Es una molécula pentamérica, compuesta por cinco subunidades de una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas, de las cuales las dos cadenas pesadas son representadas por la letra griega mu (μ); estas subunidades están unidas por la inclusión de una cadena polipeptídica J. Debido a la conformación de la molécula adquiere una actividad eficiente en la activación de la cascada clásica del complemento y la aglutinación (ya que consta de más sitios de unión a los antígenos). La IgM se encuentra de forma pentamérica circulando por el suero, pero también está ubicada de forma monomérica transmembranaria (IgMm) donde actúa como receptor específico de antígenos para reconocerlos y producir anticuerpos. ⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

La IgM es producida principalmente por las células plasmáticas que están en los ganglios linfáticos, bazo y médula ósea; circulan tanto por el torrente sanguíneo como en la linfa. Esta gammaglobulina representa el 10% de la cantidad de inmunoglobulinas en el suero. Los valores normales para hombres están dentro de 60-250 mg/dL y en mujeres de 70-280 mg/dL. Esta cantidad se puede elevar en infecciones agudas dirigidas por agentes infecciosos (bacterias, parásitos, etc.), mononucleosis infecciosa, lepra, entre otras complicaciones; y puede disminuir debido a problemas genéticos o desordenes adquiridos mediados por algunas enfermedades. ⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Inmunoglobulina G: (IgG): La IgG representa el anticuerpo más abundante en el suero, siendo entre el 70 a 80 % de las inmunoglobulinas totales, las cuales están distribuidas equitativamente en compartimientos tanto intravascular como extravascular. Es una molécula monomérica compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, de las cuales su cadena pesada está representada por la letra griega gamma (γ); estas cadenas están unidas por una región bisagra (que une las regiones Fab con Fc); esta región es muy flexible, lo que permite que cada dominio de unión a los antígenos actúe de forma independiente y permite que el anticuerpo presente una morfología de “Y” o “T” (vistas al microscopio electrónico). A diferencia de los demás anticuerpos, la IgG presenta cuatro subclases, en las cuales la diferenciación de cada uno se presentará en la cadena pesada y en la región bisagra. ⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Las características de las subclases de IgG se van a diferenciar principalmente por la forma estructural que presentan cada una de ellas, ya que, la presencia de más o menos uniones disulfuro en la región bisagra ocasiona la distinta función efectora en las que se emplean; la cantidad de uniones de sulfuro en la región bisagra ocasiona que algunas sean susceptibles a un rompimiento proteolítico, lo cual limita su función de respuesta para ciertos casos. Otras presentan funciones específicas como la IgG4 que es una de ellas que puede atravesar la placenta para darle protección al feto o en la actuación contra ciertos alérgenos donde la producción elevada de IgG4 puede neutralizar la función y elevación de las IgE. ⁽⁴⁰⁻⁴⁹⁾

Características	Subclases de IgG			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Proporción de IgG total (%)	45-75	16-48	2-8	1-12
Longitud de la bisagra de la cadena pesada (aminoácidos)	15	12	62	12
Numero de enlaces disulfuro en la bisagra	2	4	11	2
Susceptibilidad de la bisagra en la escisión proteolítica	++	+	+++	+
Vida media en suero (días)	21	21	7	21
Capacidad para activar el sistema del complemento	++	+	+++	+
Respuesta a los antígenos proteínicos	++	+	++	+
Respuesta a los antígenos de carbohidratos	+	++	-	-
Respuesta a los alérgenos	+	-	-	++

Tabla N°2: Características en la diferenciación de las subclases de IgG

Tabla descriptiva acerca de las principales característica y funciones de las subclases de anticuerpos IgG.

Fuente: Libro: Parhan P. (2016). The immune system.

Inmunoglobulina D (IgD): Este anticuerpo está formado de un monómero de cuatro cadenas, su cadena pesada está representada con la letra griega delta (δ). A diferencia de los otros anticuerpos, la IgD no es bifuncional, esto quiere decir que solo cumple con una única función, que consiste en reconocer y unirse a su respectivo antígeno; por ende, no cumple la función de favorecer la destrucción y eliminación del inmunocomplejo formado a través de la activación de mecanismos efectores.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

La cantidad IgD que se puede encontrar en una persona normal es menos del uno por ciento en el suero, su concentración equivale de 2 a 100 mg/L; además la IgD también puede formar parte de la membrana celular del linfocito B como receptor de antígenos junto con la IgM, por lo que brinda la misma diversidad en sus especificidades por los antígenos.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Inmunoglobulina A (IgA): Este anticuerpo cuando se encuentra en el suero esta en forma de un monómeros de cuatro cadenas (dos livianas y dos pesadas); su cadena pesada está representada por la letra griega alfa (α). Mientras que la IgG es la predominante en el suero; la IgA se encuentra en mayor proporción en secreciones

serosas como lágrimas, saliva, calostro, leche, genitourinarias, secreciones traqueobronquiales y fluidos intestinales; donde su forma predominante será un dímero, el cual está formado por dos monómeros de cuatro cadenas cada uno y están unidos por una cadena polipeptídica J (siendo su región bisagra).⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

La IgA presenta dos subclases, las cuales son IgA1 e IgA2. La IgA1 es la de mayor proporción, ubicándose en el 80% de todas las IgA. Esta se encuentra normalmente en forma de monómero, por lo cual es la que más se haya también en el suero (con una proporción del 15 al 20%). La IgA1 proporciona defensa contra la proteólisis, por ende, protege de las bacterias que puedan causar esta acción proteolítica. En cambio, la IgA2 se encuentra en mayor frecuencia en las secreciones y presenta una forma dímica. Al igual que la IgA1, la IgA2 proporciona una resistencia contra bacterias que puedan causar proteólisis en el ambiente de las mucosas.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Inmunoglobulina E (IgE): A diferencia de las otras gammaglobulinas, la IgE presenta una estructura monomérica en donde adicional a sus cuatro cadenas pesadas, contiene una cadena más, representada por la letra griega épsilon (ϵ); formándose de esta forma 4 dominios en su cadena pesada. Esta estructura formada de cuatro dominios (región Fc) agrega una fuerte interacción con los mastocitos y basófilos, mediante su receptor Fc ϵ RI, que al unirse con la IgE y junto con el reconocimiento de los antígenos con su porción Fab, proporcionan la liberación de histamina y heparina de las células plasmáticas, desencadenando las reacciones de hipersensibilidad o de anafilaxia en las personas cuando hay presencia de infecciones contra alimentos, sustancias tóxicas, parásitos (como helmintos), entre otras.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Se presenta dos tipos receptores para la IgE conocidos como Fc ϵ R, las cuales son I y II, la IgE tiene una alta afinidad por la Fc ϵ RI (ubicada en los mastocitos y basófilos) por lo cual es su principal receptor en las reacciones alérgicas, en cambio con Fc ϵ RII presenta una baja afinidad (se puede encontrar en los linfocitos B, macrófagos, linfocitos T Killer, células dendríticas foliculares, entre otras), su función efectora con este segundo tipo de receptor contribuye en la captura y presentación de antígenos para el reconocimiento por parte del linfocito B y linfocito T.⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

Esta inmunoglobulina se presenta en pocas cantidades en la sangre (es la de menor proporción de todas las inmunoglobulinas), con una concentración de 0 a 90 UI/ml, pero frente a una infección se puede incrementar en la sangre, adicional a ello, la vida corta de la IgE también proporciona que las cantidades en suero sean bajas pero cuando hay una infección se puede lograr unir con un mastocito de la piel, lo que resulta en una mayor duración del anticuerpo (hasta 10 días), por tal motivo no presenta la información de infección activa (por las hipersensibilidades inmediatas que puede ocasionar durante un tiempo determinado).⁽⁴⁰⁻⁴⁸⁾

IgE asociado a infecciones contra helmintos: Cuando se refiere a una infección mediado por parásitos la IgE es una muy buena candidata para la actuación en su eliminación. Esta inmunoglobulina es diferente a todas las demás, ya que por su cantidad baja en el suero no se le presta mucha atención hasta que empieza a incrementarse; es una gammaglobulina muy eficiente debido a su alta afinidad por las uniones con sus receptores específicos en los mastocitos, eosinófilos y los basófilos que ocasionan la reacción alérgica cutánea por las histaminas que liberan debido a la degranulación de estas células. Esta reacción es inmediata y se aprecia por ronchas, eritemas en la piel de forma visual por ser un órgano externo; pero, en caso de los helmintos que están en órganos internos la inflamación presentada se visualizará por medio de una biopsia, los signos adicionales que se pueden presentar y que conlleve a la sospecha de esta infección son: la elevación de este anticuerpo (IgE) en el suero, posibles problemas respiratorios asemejados al asma o hasta malestar ocular.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

La producción de la IgE en presencia de una infección por helmintos se presenta como una hipersensibilidad inmediata tipo I, la cual, esta reacción se basa por dos células que son los linfocitos Th1 y Th2, en específico estas reacciones producidas están mediadas por los linfocitos Th2 para la protección contra los helmintos. Ello implica que la producción de IgE esté controlada por los linfocitos T. Esta producción de IgE mediada por la IL-4 que produce los eosinófilos junto con un trabajo conjunto de la IL-5 aporta en la defensa contra helmintos y con la activación de los mastocitos, en el tubo digestivo aumenta el peristaltismo y producción del moco, permitiendo la expulsión de los parásitos. A ello se considera que cualquier

sensibilización que genere una respuesta Th1 o que tenga alguna alteración de la IL-4 podrá inhibir la producción de IgE. ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

Isotipo de anticuerpo	Subtipos (cadena H)	Concentración sérica (mg/ml)	Semivida en suero (días)	Forma secretada	Funciones
IgA	IgA 1, 2 ($\alpha 1$ o $\alpha 2$)	3.5	6	IgA (dímero) Monómero, dímero, trímero	Inmunidad de mucosas
IgD	Ninguno (δ)	Mínima	3	Ninguna	Receptor para el antígeno del linfocito B virgen
IgE	Ninguno (ϵ)	0.05	2	Monómero de IgE	Defensa contra parásitos helmintos, hipersensibilidad inmediata
IgG	IgG 1-4 ($\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$)	13.5	23	Monómero de IgG1	Opsonización, activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, inmunidad neonatal, inhibición por retroalimentación de linfocitos B
IgM	Ninguno (μ)	1.5	5	Pentámero de IgM	Receptor para el antígeno del linfocito B virgen, activación del complemento

Tabla N°3: Tabla resumen de Isotipos de anticuerpos

Tabla donde se presenta cada anticuerpo, junto con sus respectivas características (como subtipos, concentraciones, semividas y la forma secretada) y sus funciones, además de gráficos del cómo se representan.

Fuente: Libro: Abbas A. y cols (2012). Inmunología: celular y molecular.

1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

➤ ESTANDARIZACIÓN

Es el proceso por el cual se ajusta una técnica o una actividad a un patrón o tipo común establecido, con lo cual lleva a presentar pasos determinados para obtener resultados previstos. ^(53, 54)

➤ RF-ABSORBENT

Esta sustancia por su nombre “Rheumatoid factor – absorbent”, contiene anticuerpos IgG; con este reactivo se podrá eliminar o disminuir significativamente la cantidad de anticuerpos IgG en el suero del paciente para que no ocurra alguna interferencia en la prueba (altos niveles de anticuerpos IgG podrían causar resultados inespecíficos como falsos positivos o falsos negativos, debido a la interacción de algunas uniones con los anticuerpos IgG). Por ejemplo, esta sustancia es utilizada en los ensayos de ELISA IgM con el fin de realizar una pre-adsorción de las sustancias interferentes en la prueba (como factores reumatoides u otro componente del suero capaz de provocar señales inespecíficas). ^(55, 56)

➤ PAPEL DE NITROCELULOSA

Papel hecho a base de proteína vegetal, utilizando la soya u otras plantas que por sus propiedades pueden dar más resistencia al papel y adicionarle características para trabajos diversos. Este papel permite una interacción de cargas para la adherencia de diferentes proteínas, perdurando por más tiempo en él, además que al contacto con el agua tiene mayor resistencia. También en su elaboración se le puede añadir componentes que incrementen sus propiedades como es el caso del grafeno, entre otros. ^(57,58)

➤ DIAMINOBENCIDINA (DAB)

Producto químico, conocido como 3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), el cual se usa en algunas pruebas inmunohistoquímicas que nos brinda una coloración permanente en ciertos tejidos. En pruebas inmunológicas los anticuerpos se conjugan con una enzima peroxidasa, que al unirse brindan una coloración marrón oscuro, dándonos la información de la presencia de la sustancia analizada. La mejor ventaja es que la coloración perdura por más tiempo. También se usa en pruebas de ELISA.⁽⁵⁹⁾

➤ CONJUGADO

Anticuerpo unido a una enzima elaborada artificialmente que permitirá la interacción de ciertos compuestos específicos, como por ejemplo para esta prueba se usará un anti-anticuerpo IgE unido a una enzima peroxidasa, que reconocerá a su respectivo anticuerpo específico, por ello al momento de incluir la sustancia reveladora formará un color verificando la presencia de esta interacción.⁽⁶⁰⁾

1.4.3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Se puede establecer la estandarización de un Dot-ELISA y la detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.

CAPÍTULO II: MÉTODOS

CAPÍTULO II: MÉTODOS

2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Cualitativo, cuasi-experimental y prospectivo: El presente estudio es **cualitativo**, debido a que se desea conocer la presencia o ausencia del anticuerpo IgE contra *Toxocara* en las muestras seleccionadas; es **cuasi-experimental**, porque no se tiene un grupo control propiamente dicho, la selección de sueros ya almacenados y descritos, manifiesta que no se ha producido alteración de las variables del estudio por el investigador para un grupo control, llevándose a cabo experimentos con esas condiciones; es **prospectivo**, debido a que el estudio presenta una herramienta preliminar para la detección de anticuerpos IgE contra *Toxocara*, con la cual se podrá desarrollar otros estudios tomando como un punto de partida este trabajo.

2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El propósito del estudio consiste en poder estandarizar un Dot-ELISA y detectar anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana. La recolección de datos será mediante la selección de sueros almacenados en la seroteca de la sección de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical – UNMSM que cumpla con los criterios de inclusión y de exclusión para este trabajo. El protocolo a seguir para el estudio, consiste en determinar los parámetros necesarios para la detección de anticuerpos IgE mediante un diseño nuevo e innovador de la técnica Dot-ELISA. El tipo de investigación es cualitativo, cuasi-experimental y prospectivo. Algunas objeciones del estudio se entornarían a la cantidad de anticuerpos IgE en los sueros almacenados, posibles fallas de equipos durante el experimento que alteren la prueba, falla de los reactivos empleados o búsqueda de nuevos reactivos para su correcto rendimiento. Se desarrollará en un periodo de tiempo de cuatro meses a más, debido a la variabilidad que se puede presentar en el proceso. El rendimiento de la prueba será medida mediante los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo, negativo luego de la obtención de los resultados, donde estos valores mientras más próximos a 100% presentaran mejores resultados en la prueba.

2.1.3. POBLACIÓN

Sueros positivos a Toxocariosis, sueros negativos de personas supuestamente sanas y sueros de otras parasitosis similares provenientes de la seroteca de la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical. “Daniel A. Carrión”. UNMSM.

2.1.4. MUESTRA

Se procesó un total de 200 muestras de sueros, siendo 120 sueros de otras parasitosis (18 sueros de *Ascaris lumbricoides*, 12 de *Hymenolepis spp.*, 20 de *Trichuris trichiura*, 5 de Uncinaria., 4 de *Enterobius vermicularis*, 3 de *Taenia spp*, 3 de Cisticercosis, 2 de *Fasciola hepática*, 20 de *Strongyloides stercoralis*, 1 de *Diphyllobothrium pacificum*, 11 de *Leishmania spp*, 1 de *Plasmodium vivax* y 20 sueros para la enfermedad de Chagas); 40 sueros de pacientes supuestamente sanos y 40 sueros positivos en el serodiagnóstico en la prueba de Western Blot IgG para *Toxocara* (que adicional cada muestra presenta una eosinofilia, diagnosticada por un hemograma).

2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Los sueros fueron seleccionados de la seroteca siguiendo la lista presentada en el punto 2.1.4. de muestras.

2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Se excluyó los sueros que no hayan sido almacenados correctamente y aquellos no pertenecientes a la lista presentada en el punto 2.1.4.

2.1.5. VARIABLES

2.1.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE

- **Detección de anticuerpos IgE:** Es el proceso por el cual se utiliza técnicas específicas para realizar el reconocimiento de los anticuerpos y de esta forma poderlos identificar. Cuando se producen los anticuerpos circulantes por la presencia de alguna sustancia desconocida para el organismo (antígeno) se

formará una unión de antígeno-anticuerpo donde, estos anticuerpos serán significativos para conocer la situación de esa infección; debido a ello, la determinación de anticuerpos específicos frente a una infección mediante una prueba de diagnóstico, ayudará a identificarla y tratarla. En este trabajo mediante la estandarización de la técnica de Dot-ELISA diseñada para poder detectar los anticuerpos o inmunoglobulinas circulantes E (IgE) presentes en los sueros utilizados, se podrá determinar mejor la situación de la Toxocariosis que se encuentra en una persona.

2.1.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE

- **Estandarización de un Dot-ELISA:** Proceso donde se establecen valores apropiados para una prueba en estudio, brindándonos una serie de pasos para su buen funcionamiento y desempeño en el uso del problema presentado. Constará de la descripción de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo mediante el uso de fórmulas ya establecidas para cada dimensión mencionada. En el trabajo realizado mientras estos valores sean más próximos al 100%, mejor será el desempeño de la prueba para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.

2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se trabajó sueros con resultados ya descritos, donde la técnica consistió en la observación del efecto de cada uno de estos sueros con la técnica empleada utilizada durante el proceso de estandarización. El instrumento de recolección de datos consistió en una tabla diseñada en el programa Excel por el autor para sacar la máxima e importante información en el trabajo de investigación (la tabla de recolección de datos se adjunta en el Anexo 11).

2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

El procedimiento consistió en encontrar cada etapa para la técnica y luego con ello organizar los resultados que se encontraron mediante el programa Microsoft Office Excel 2016 donde se archivó los datos obtenidos en una hoja de trabajo. Luego los resultados fueron representados en una tabla 2x2 para disponer de los datos

obtenidos durante la prueba y realizar los cálculos de sensibilidad, especificidad y los valores predictivos. Luego para presentar de forma didáctica se utilizó gráficos para representar resultados significantes en el trabajo.

2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras fueron proporcionadas por la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical, con sus respectivos resultados, solo se trabajó con los resultados de las muestras, por lo que la identidad de cada muestra no estaba involucrada y ninguna persona ha sido expuesta a los efectos adversos de la recolección de muestras durante este trabajo. Se adjunta en Anexos los documentos para el correcto uso de los sueros utilizados para este trabajo. (Anexos: 8, 9 y 10).

2.2. DISEÑO PROCEDIMENTAL

2.2.1. PEGADO DEL ANTÍGENO

Para realizar el pegado del antígeno en la tira de nitrocelulosa se utilizó el buffer carbonato-bicarbonato con un pH igual a 9.6, además se agregó ovoalbúmina al 2% y antígeno base; luego se colocó 2 uL de la dilución realizada en cada tira. Se dejó secar en una estufa a 37 °C por una hora. Y se bloqueó las uniones inespecíficas por dos días en buffer PBS-Tween20-BSA al 3% de 2 a 8 °C.

2.2.2. OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO

Para obtener la cantidad óptima de concentración del antígeno se procedió a evaluar diferentes diluciones a partir del antígeno TES obtenido, siendo este de 10.46 mg/mL. Las diluciones que se trabajaron fueron: 30, 20, 10, 5 y 1 ug/mL. De las cuales la reacción se presentó en concentración de 10 ug/mL.

2.2.3. BUFFER DE DILUCIÓN

Para realizar las diluciones de los sueros se utilizó dos buffers diferentes como es el PBS-Tween20 (buffer fosfato salino) con Leche descremada al 5% y PBS-Tween20 con BSA (albúmina bovina sérica) al 3%. Como resultado el BSA al 3% proporciono

mejores resultados en la unión del anticuerpo con el antígeno al momento de la incubación.

2.2.4. PREPARACIÓN DE LOS SUEROS

Para los sueros se trabajó con diferentes diluciones con el buffer PBS-Tween20 con BSA al 3% más el RF-Absorbent, siendo estas: 1/200, 1/100, 1/50, 1/20 y 1/10 dils. Debido a la adición del RF-absorbent se incubó de 2 a 8 °C de 18 hasta 24 horas. La dilución óptima de los sueros fue de 1/10 dils.

2.2.5. TIEMPO DE UNIÓN DEL ANTÍGENO-ANTICUERPO

Al momento de obtener el suero ya tratado con el RF-absorbent se prosiguió a enfrentarlo con la tira donde estaba el antígeno; el tiempo para que esta unión se produzca adecuadamente fue de 18 a 24 horas en una incubación de 37 °C.

2.2.6. OBTENCIÓN DEL CONJUGADO

El conjugado se trabajó con tres diluciones diferentes en BSA al 3 %: 1/2000, 1/1000 y 1/500 dils. Adicional a ello se comprobó el tiempo óptimo de la incubación trabajando a 45, 90, 120 y 180 minutos. Los mejores resultados se obtuvieron en una dilución de 1/500 dils en 180 minutos incubando a 37 °C.

2.2.7. SUSTRATO-CROMÓGENO

Para el cromógeno se utilizó la diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromógeno que mediante la adición del peróxido de hidrógeno en un buffer citrato-fosfato con pH igual a cinco, nos brindó una coloración marrón indicando el reconocimiento específico del anticuerpo conjugado.

2.2.8. SOLUCION DE LAVADO

Para retirar los excedentes de anticuerpos o de los anticuerpos conjugados en sus órdenes de uso respectivo, se prosiguió a sumergir las tiras en la solución de Cloruro de Sodio (NaCl) + Tween 20 concentrado al 0.3% (conocido también como solución salina fisiológica + Tween 20), durante un tiempo de 5 minutos, luego con un papel absorbente quitar la mayor humedad de la tira.

Resumen del protocolo de trabajo

Dados los resultados de la estandarización, podemos describir el proceso mediante los siguientes pasos; una vez preparada las tiras de nitrocelulosa (diseño de conformación de componentes, anexo 1) junto con los antígenos, la técnica la podemos dividir en tres partes que consta de un día para cada proceso (diseño del protocolo, anexo 2 y 3):

Primer día, preparación del suero

1. Realizar una dilución del suero junto con el RF-Absorbent de 1/10
2. Incubar de 18 a 24 horas en una temperatura de 4 °C.

Segundo día, reacción antígeno-anticuerpo

1. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos
2. Separar el sobrenadante en otro eppendorf y descartar el precipitado.
3. Sumergir la tira de nitrocelulosa preparada con el antígeno dentro del eppendorf que presenta el sobrenadante.
4. Incubar de 18 a 24 horas en una temperatura de 37 °C.

Tercer día, conjugado y revelado

1. Lavar la tira de nitrocelulosa con solución de NaCl + Tween 20 al 0.3% por 5 min, luego secar con papel absorbente.
2. Preparar la dilución del anticuerpo conjugado de 1/500 dils.
3. Sumergir la tira de nitrocelulosa en la dilución preparada del conjugado.
4. Incubar por 3 horas a 37 °C.
5. Lavar la tira de nitrocelulosa con solución de NaCl + Tween 20 al 0.3% por 5 min, luego secar con papel absorbente.
6. Preparar la sustancia reveladora usando DAB + peróxido de hidrogeno + buffer citrato, cantidad suficiente.
7. Sumergir la tira de nitrocelulosa y mecer suavemente hasta observar presencia de coloración en el control positivo.
8. Detener la reacción con agua corriente.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

CAPÍTULO III: RESULTADOS

Siguiendo lo establecido en el protocolo de ejecución, separando tiras diseñadas especialmente para este trabajo y con un plan de trabajo ordenado para cada condición, se obtuvo los siguientes resultados:

Para la estandarización de los tiempos, temperaturas, concentraciones y diluciones se utilizó el control positivo, para lo cual se obtuvo: para la parte 1 del plan de trabajo (Anexo 2), comenzando en la preparación del suero, según el inserto se podía proceder a los 15 min o luego de 18 a 24 horas, de tal forma que se consideró luego de las pruebas que de 18 a 24 horas presentaba mejores resultados para una mejor precipitación de los anticuerpos IgG; junto con una temperatura de incubación de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$; luego para los tiempos en la incubación del antígeno-anticuerpo no se observó ninguna reacción en los tiempos de 45, 90 y 180 minutos al momento de la incubación, pero teniendo una buena reacción luego de 18 a 24 horas de incubación; en la selección de temperatura, las reacciones trabajadas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2$, se encontró mínima reacción hasta en la concentración de 30 mg/dL de antígeno, lo que no permitió observar buenos resultados, luego en temperatura ambiente (TA $^{\circ}\text{C}$) e incubando a 37°C presentó reacción, pero considerando que la temperatura ambiente fue trabajada sin condiciones precisas, se optó por escoger la temperatura de 37°C para un mejor control de la estandarización; las concentraciones trabajadas, siendo de 1 y 5 mg/dL la reacción no fue nítida, por lo cual donde se visualizó la mínima reacción nítida fue en 10 mg/dL, siendo que, con las concentraciones de 20 y 30 mg/dL la reacción se presentaba con mayor contraste de tinción.

Continuando con la parte del 2 del plan de trabajo (Anexo 3), principalmente a evaluar las diluciones, temperatura y tiempo del conjugado; describiendo primero el tiempo de incubación utilizado, siendo que a 45 y 90 minutos la reacción obtenida no era nítida y no se eligió esos tiempos; la reacción fue mejor alcanzando los 180 minutos; para la temperatura empleada, cada temperatura inicial se consideró trabajar con cada una de las temperaturas empleadas siendo las combinaciones de temperaturas (el primer dígito representa la temperatura empleada en la primera parte en la reacción de antígeno-anticuerpo y el segundo dígito siguiente del guión representa la temperatura empleada en la segunda parte con el anticuerpo

conjugado): 4°C–4°C, 4°C–TA°C, 4°C–37°C, TA°C–4°C, TA°C–TA°C, TA°C–37°C, 37°C–4°C, 37°C–TA°C, 37°C–37°C, obteniendo mejores resultados en la incubación de 37°C–37°C; en la evaluación de las diluciones óptimas se trabajó el conjugado con diluciones de 1/500, 1/1000 y 1/2000, dando buenos resultados con la dilución de 1/500 dils del anticuerpo conjugado con la enzima.

Después de obtener los resultados estandarizados de la técnica, se prosiguió a validar la técnica, donde principalmente predomina el hallazgo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (positivo y negativo).

La sensibilidad fue determinada procesando sueros que presentaron positividad a la técnica de Western Blot IgG para *Toxocara*, se trabajó con 40 sueros positivos, de los cuales 39 resultaron positivos para la prueba estandarizada, dando una sensibilidad del 97.5%. Para la especificidad se procesó 160 sueros de pacientes con otras parasitosis y pacientes supuestamente sanos; de los cuales 40 sueros pertenecían a pacientes supuestamente sanos y para la prueba los 40 resultaron negativos (100%); luego 120 sueros eran diagnosticados con diferentes parasitosis, donde: de un total de 18 sueros positivos para *Ascaris lumbricoides* utilizados en este trabajo, los 18 resultaron negativos para la prueba (100%); de 20 sueros para *Hymenolepis spp.* 20 resultaron negativos (100%); de 20 sueros para *Trichuris trichiura*, 20 resultaron negativos (100%); de 5 sueros para Uncinaria, 5 resultaron negativos (100%); de 4 sueros para *Enterobius vermicularis*, 4 resultaron negativos (100%); de 3 sueros para *Taenia spp.*, 3 resultaron negativos (100%); de 3 sueros para Cisticercosis, 3 resultaron negativos (100%); de 2 sueros para *Fasciola hepática*, 2 resultaron negativos (100%); de 20 sueros para *Strongyloides stercoralis*, 20 resultaron negativos (100%); de 1 suero para *Diphyllobothrium pacificum*, 1 resultó negativo (100%); de 11 sueros para *Leishmania spp*, 9 resultaron negativos (81.19%); de 1 suero para *Plasmodium vivax*, 1 resultó negativo (100%); de 20 sueros para Chagas, 18 resultaron negativos (90%). Juntando todos estos valores porcentuales, resulta en una especificidad de 97.5%.

Los valores predictivos fueron hallados siguiendo sus respectivas formulas (véase tabla N° 5), siendo para el valor positivo y negativo del 90.69% y 99.36% respectivamente.

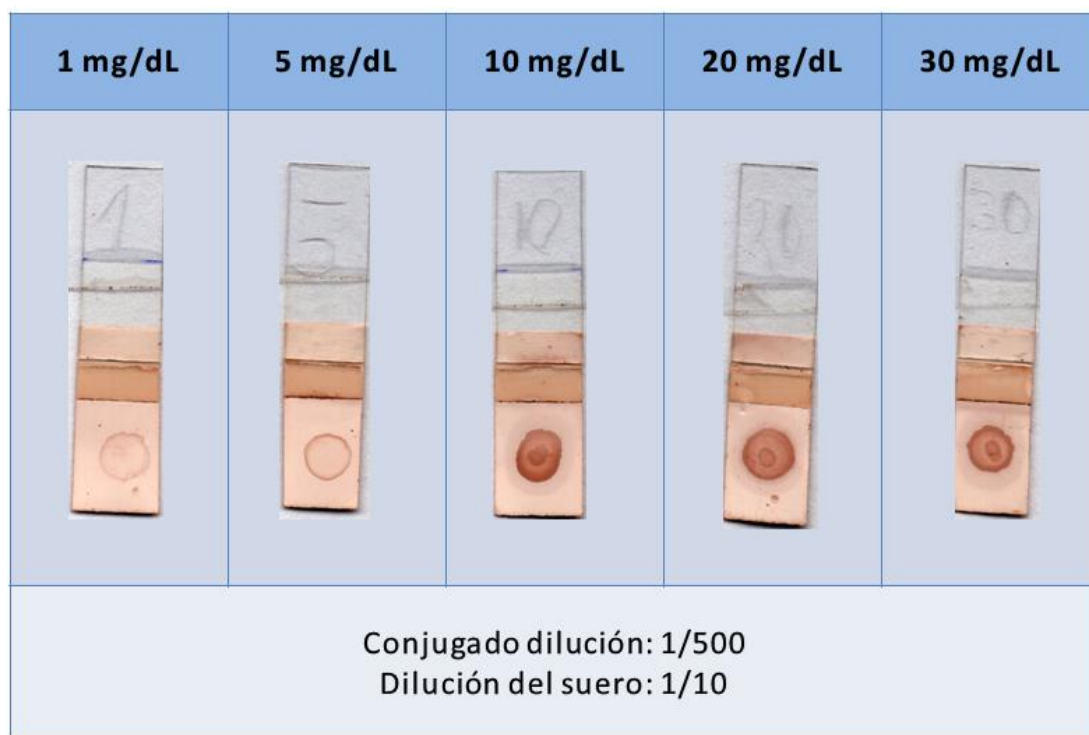


Figura N° 7: Resultado del conjugado diluido 1/500

Mediante un control positivo (conglomerado de varios sueros reactivos a IgE para Toxocariosis) se trabajó en las diferentes concentraciones de antígenos en las tiras con nitrocelulosa (1mg/dL, 5mg/dL, 10 mg/dL, 20 mg/dL, 30 mg/dL). Se observa como la mínima reacción bien definida está en la tira donde la concentración es 10 mg/dL.











1 mg/dL	5 mg/dL	10 mg/dL	20 mg/dL	30 mg/dL
				
Conjugado dilución: 1/1000 Dilución del suero: 1/10				
1 mg/dL	5 mg/dL	10 mg/dL	20 mg/dL	30 mg/dL
				
Conjugado dilución: 1/2000 Dilución del suero: 1/10				

Figura N° 8: Conjugados diluidos a otras concentraciones

Mediante un control positivo (conglomerado de varios sueros reactivos a IgE para Toxocariosis) se trabajó en las diferentes concentraciones de antígenos en las tiras con nitrocelulosa (1mg/dL, 5mg/dL, 10 mg/dL, 20 mg/dL, 30 mg/dL) y a conjugados diluidos en 1/2000 y 1/1000. La mínima concentración bien definida se sigue presentando en la concentración del antígeno de 10 mg/dL.

















Resultados coloración															
C+	As	H.sp	Tt	Un	Ev	Ta	Cc	Fh	Ss	Dp	Lsh	Pv	Ch	Pss	Ppwb
															

Figura N° 9: Resumen de resultados

Cuadro de resultados de los diferentes sueros trabajados, donde: C+=control positivo, As =*Ascaris lumbricoides*, H. sp = *Hymenolepis spp*, Tt = *Trichuris trichiura*, Un = *Uncinaria*, Ev = *Enterobius vermicularis*, Ta =*Taenia spp*, Cc = Cisticercosis, Fh = *Fasciola hepática*, Ss = *Strongyloides stercoralis*, Dp = *Diphylobothrium pacificum*, Lsh = *Leishmania spp*, Pv = *Plasmodium vivax*, Ch = Chagas, Pss = Pacientes supuestamente sanos, Ppwb = Pacientes positivos al western Blot. Se observa que las tiras que presentan una marca redonda bien definida y coloreada resultaron positivas en la prueba.

Tabla N° 4: Número de resultados por cada parasitosis

En el cuadro se observa las cantidades de sueros corridos para cada parasitosis, pacientes supuestamente sanos y pacientes positivos al Western Blot, además observar la cantidad de sueros que resultaron positivos y negativos.

RESULTADOS DOT-ELISA IgE						
	N°	SUEROS	COD.	N° Sueros Total	N° SUEROS POSITIVOS AL DOT- ELISA IgE	N° SUEROS NEGATIVOS AL DOT- ELISA IgE
ESPECIFICIDAD	1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	As	18	0	18
	2	<i>Hymenolepis spp.</i>	H sp.	12	0	12
	3	<i>Trichuris trichiura</i>	Tt	20	0	20
	4	Uncinaria	Un	5	0	5
	5	<i>Enterobius vermicularis</i>	Ev	4	0	4
	6	<i>Taenia spp</i>	Ta	3	0	3
	7	Cisticercosis	Cc	3	0	3
	8	<i>Fasciola hepática</i>	Fh	2	0	2
	9	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Ss	20	0	20
	10	<i>Diphyllobothrium pacificum</i>	Dp	1	0	1
	11	<i>Leishmania spp</i>	Lsh	11	2	9
	12	<i>Plasmodium vivax</i>	Pv	1	0	1
	13	Chagas	Ch	20	2	18
	14	Pacientes supuestamente sanos	Pss	40	0	40
		TOTAL		160	4	156
SENSI-BILIDAD		Sueros positivos de <i>Toxocara</i> a Western Blot IgG	Ppwb	40	39	1

Tabla N° 5: Cuadro de doble entrada para determinar valores predictivos

En el siguiente cuadro de doble entrada se presenta los valores numéricos de las cantidades usadas de sueros.

	Personas diagnosticadas con Toxocariosis	Personas supuestamente sanas y de otras parasitosis	TOTAL
Prueba positiva	39	4	43
Prueba negativa	1	156	157
TOTAL	40	160	200

De la tabla N° 5 y usando las fórmulas correspondientes se extrae los valores de:

Sensibilidad: Es igual al número de sueros de personas diagnosticadas con Toxocariosis que resultaron positivas para la prueba, dividido entre el total de sueros de personas diagnosticadas con Toxocariosis usadas. Luego se multiplica por 100% dándonos el valor de 97.5%.

Especificidad: Es igual al número de los sueros de las personas supuestamente sanas y de otras parasitosis que resultaron negativas para la prueba, dividido entre el total de sueros de personas supuestamente sanas y de otras parasitosis usadas. Luego se multiplica por 100% dándonos el valor de 97.5%.

Valor predictivo positivo: Es igual al número de sueros de personas diagnosticadas con Toxocariosis que resultaron positivas para la prueba, dividido entre el total de sueros que resultaron positivos para la prueba. Luego multiplicado por 100% dándonos el valor de 90.69%.

Valor predictivo negativo: Es igual al número de los sueros de las personas supuestamente sanas y de otras parasitosis que resultaron negativas para la prueba, dividido entre el total de sueros que resultaron negativos para la prueba. Luego multiplicado por 100% dándonos el valor de 99.36%.

Tabla N° 6: Cuadro resumen del protocolo

Tabla resumen donde se muestra todos los parámetros encontrados en la prueba, de esta forma generando un protocolo de trabajo para la técnica.

CONDICIONES	VALORES NUMÉRICOS	UNIDADES	TIEMPO INCUBACIÓN
CONCENTRACIÓN ANTÍGENO	10	ug/dL	---
DILUCIÓN DEL SUERO	1/10	dils	---
SUERO+RF+BUFFER TEMPERATURA	4	°C	18-24 H
TEMPERATURA RX Ag-Ac	37	°C	18-24 H
DILUCIÓN DEL CONJUGADO	1/500	dils	---
TEMPERATURA DEL CONJUGADO	37	°C	3 H

Tabla N° 7: Tabla resumen de los valores de la prueba

En la tabla resumen se presenta los resultados donde la especificidad está dada por los 160 sueros mencionados y la sensibilidad por los 40 sueros positivos.

ESPECIFICIDAD	97.50%	sueros corridos - 160
SENSIBILIDAD	97.50%	sueros corridos - 40
V.P.P	90.69%	
V.P.N	99.36%	

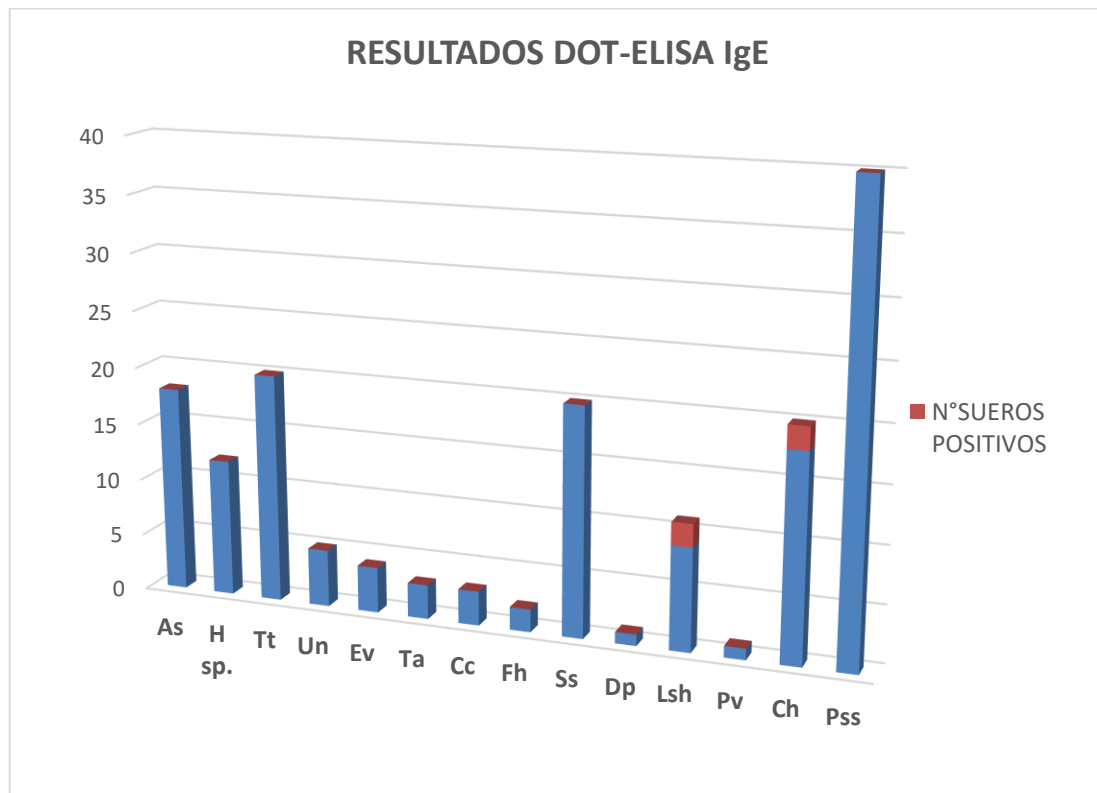


Figura N° 10: Gráfico de cantidad de muestras por parasitosis

Se presenta en la gráfica a los sueros que conforman la especificidad utilizados en este trabajo (sueros de personas supuestamente sanas junto con sueros de otras parasitosis). El color en rojo determina los sueros que resultaron positivos en la prueba, siendo estos de las infecciones de Leishmania (Lsh) y Chagas (Ch).

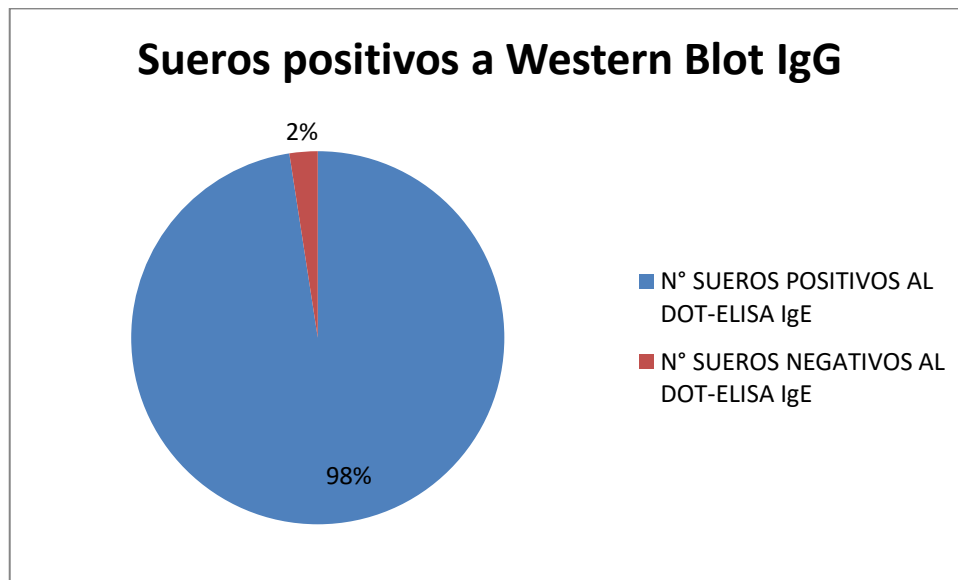


Figura N° 11: Gráfico resumen de resultados de muestras positivas

En el gráfico se muestra los resultados de los sueros positivos al Western Blot utilizando la prueba Dot-ELISA IgE donde resultó un 2% negativo.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

La Toxocariosis humana no ha sido un punto de estudio resaltante al pasar los años; el contagio es mínimo en ciertos sectores sociales, el diagnóstico no ha sido muy claro en las personas por las técnicas tediosas que se tienen actualmente (excluyendo las pruebas serológicas, como por ejemplo las biopsias), adicional a ello en el perro o gato también no se considera como una infección muy frecuente en la actualidad (se considera como una tercera posibilidad de infección, sin embargo en lugares con estratos socioeconómicos bajos si es predominante); pero aun así los casos han estado presentes. Debido a ello, el haber tenido estas condiciones para encontrar esta infección, provocó un incremento en la presencia de casos que se tenían, incluso en llegar a lugares del mundo donde el estatus social y económico es alto. Por ello es que se ha visto la posibilidad de seguir ampliando en las herramientas de apoyo para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.

En la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se ha estado trabajando con una técnica Dot-ELISA para determinar anticuerpos IgG, esta técnica fue desarrollada en el mismo instituto (*In house o nativo del I.M.T.D.A.C.*), es una técnica muy eficiente que se elaboró debido a que las personas que llegaban con ciertos síntomas congruentes con la infección, tanto referenciados de otros centros de salud, como personas que iban por una consulta ambulatoria (donde su mayor información de referencia era la eosinofilia y el incremento de las células plasmáticas como los eosinófilos que se manifestaban mediante un examen de hemograma junto a otros signos en las personas, representaban la mayor sospecha de Toxocariosis por los médicos tratantes); pero a pesar de manifestar los síntomas no todos presentaban Toxocariosis y lo preocupante es que debido al tratamiento empleado, siendo este fuerte para la persona (por el trabajo extra para el hígado, quien se encarga de procesar el medicamento); por ello esta técnica ayudó en un tamizaje de todas las personas que llegaban al instituto con estas características, mejorando su atención de salud y no arriesgando a personas sanas a cursar por el tratamiento. Con la creación de la técnica se fue realizando diversos trabajos como por ejemplo el grupo de investigación de Espinoza y cols con el tema: “Prevalencia estimada de Toxocariosis

en la región de Lima” (2016) ⁽³⁾; tesis presentada por Cornejo, “Frecuencia de anticuerpos anti-*Toxocara canis* detectados mediante la prueba Dot-ELISA en pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” durante el periodo 2006-2008.” (2009) ⁽²⁰⁾; el grupo de Roldán y cols en “Frecuencia de Toxocariosis humana en una población rural de Cajamarca, Perú.” (2009) (traducido) ⁽²¹⁾; entre otros; donde en todos estos trabajos se ha ido demostrando la eficacia y facilidad del uso de esa técnica para detectar anticuerpos IgG permitiendo de igual forma el seguir mejorando la técnica y brindar un mejor aporte en el diagnóstico de la Toxocariosis humana.

Los datos que proporciona la técnica de Dot-ELISA IgG, nos permite determinar si la persona ha tenido algún contacto con el parásito, reciente o previamente; debido a que es una técnica semi-cuantitativa, mediante la determinación de títulos obtenidos en la muestra, nos brinda la información sobre, si la infección es reiterativa y/o que el tratamiento está surtiendo efecto; pero a pesar de conocer esos datos no se tenía una técnica para saber si la persona tiene la infección activa, porque los anticuerpos IgG actúan como memoria, dando una acción más rápida del sistema inmune, así que la disminución de estas inmunoglobulinas (IgG) no determina que la larva migrans desaparezca totalmente, para ello se prosiguió a estandarizar una nueva técnica con mejor especificidad hacia la infección, donde el detectar anticuerpo IgE, proporciona la herramienta para encontrar si es una enfermedad activa, brindando el conocimiento de la presencia de la larva migrans y adicional a ello, los datos del seguimiento en el tratamiento, debido a que la presencia del parásito seguirá elevando anticuerpos pese a un tratamiento brindado, ya que las personas pueden actuar de distinta manera ante el mismo medicamento. Con ello se evitará el uso insistente de un medicamento en casos que no lo requieran y ayudará al médico tratante a encontrar otras alternativas en el tratamiento de esos casos. En caso el tratamiento resulte satisfactoriamente, la cantidad de inmunoglobulinas IgE disminuye, con lo que desaparecerá la infección activa.

En la estandarización de la técnica para detectar anticuerpos IgE, se trató de seguir ciertos procedimientos descritos en otros trabajos, realizando algunos cambios debido a la necesidad del funcionamiento de la prueba, como es con el caso del

diseño de la tira empleada, primero se buscó asemejar la tira de nitrocelulosa a la tira que se usa para la detección de IgG, que se estandarizó en el mismo laboratorio, pero debido a inconvenientes con las diferentes temperaturas, en especial a 37°C, donde la cámara húmeda se secaba rápidamente, sin alcanzar los tiempos más extensos, debido a ello, se buscó una forma capaz de que la tira permanezca sumergida, sin presentar demasiada evaporación a esa temperatura, obteniendo el diseño presentado en el Anexo 1; luego se buscó el buffer apropiado para realizar las diluciones, se evaluó el uso de PBS-Tween20 con leche descremada como en el trabajo de Vildozola y cols ⁽¹³⁾ o como en el grupo de Mika y cols ⁽¹⁵⁾, el cual resultó muy beneficioso para sus trabajos, pero con la leche descremada no se visualizó la presencia de color en los resultados en la técnica de Dot-ELISA IgE, se presentaba de forma negativa el control positivo de trabajo, además también se presentaba la dificultad en la separación del precipitado con el sobrenadante con el uso del RF-absorbent, debido a la similitud de color entre la leche y el precipitado. Por lo cual intentando otras soluciones de dilución se prosiguió a utilizar PBS-Tween20 más albúmina bovina sérica (BSA) y se obtuvo mejores resultados, al momento de realizar la dilución junto con el RF-absorbent (reactivo capaz de precipitar los anticuerpos IgG en exceso que podrían ocasionar alguna interrupción en la prueba y con ello facilitar una mejor unión entre los anticuerpos IgE con el antígeno TES) consiguiendo buenos resultados como en el trabajo de Magnaval y cols ⁽⁶¹⁾, donde se describió una técnica nueva en su época, presentando el ELISA IgE para *Toxocara*, dando buenos resultados, se siguió el uso del antígeno TES que junto con la adición del suero presentaba buena sensibilidad y especificidad; luego en el grupo de investigación de Atta y cols, ⁽⁶²⁾ los cuales emplearon también dos aditivos para evitar la interferencia de anticuerpos IgG en la prueba (uno de ellos era el RF-Absorbent y el otro una proteína G específica), observando al igual que en este trabajo, que con el reactivo de RF-Absorbent mejora el rendimiento de la detección de anticuerpos IgE y después de la centrifugación el precipitado se identificaba mejor, ya que era de color blanco, mientras que el sobrenadante era incoloro, pudiéndose separar con cuidado el sobrenadante del precipitado. El PBS-Tween20-BSA de igual forma se utilizó para las diluciones del conjugado, el cual luego de agregar la sustancia reveladora no necesitaba de mucho tiempo para su reacción, dando buenos resultados. En el caso de

los lavados se evaluó realizar una técnica sencilla y con bajo costo, utilizando para ello Cloruro de Sodio + Tween 20 al 0.3% (suero fisiológico + Tween 20), el cual no interfirió en la prueba y brindó buenos resultados evitando la aparición de los precipitados excesivos o groseros por la interferencia del exceso de un elemento en la reacción (rude background), en comparación de los trabajos como de Magnaval y cols o de Atta y cols, donde realizan los lavados con PBS-tween20 para retirar estos excesos de elementos en la prueba. En comparación a los trabajos antecedentes a esta estandarización, se presentan claramente que las técnicas utilizadas son diferentes, las técnicas descritas que han servido de guías son de tipo ELISA, los cuales se realizan en una plataforma sólida de policarbonato, además de algunos reactivos distintos empleados en cada prueba, esta técnica de Dot-ELISA, se realiza en una plataforma sólida de papel de nitrocelulosa, lo cual requiere de distintos parámetros, esto se observa en la utilización del tiempo para las distintas etapas de reacción, excepto en la etapa de pegado del antígeno a la plataforma base, donde tanto en los trabajos ya mencionados (como de Magnaval, Atta, Vildozola), el procedimiento es idéntico en tiempo; las variaciones encontradas empezarán a visualizarse al momento de experimentar la fase de reacción del antígeno-anticuerpo, donde el trabajo estandarizado se prolonga, siendo la encontrada de 18 a 24 horas, coincidiendo con el trabajo de Atta y cols y Vildozola y cols, esta coincidencia nos podría dar un indicio del comportamiento de la IgE en estas pruebas debido a que para dicha reacción se necesita un tiempo prolongado para un mejor rendimiento, pero en el trabajo de Magnaval y cols, esta etapa resultó diferente debido a que la incubación solo fue de 3 horas, posiblemente se podría dar al tipo de antígeno usado, como por ejemplo en los trabajos de Mika y cols o de Wang y cols, el antígeno puede ser seleccionado o creado artificialmente, lo cual presentará la posibilidad de mejores o peores resultados en la prueba. Luego en el tiempo empleado para la reacción del anticuerpo conjugado, se presenta otra diferencia con el trabajo de Atta y cols, el cual emplea 1 hora para esta etapa, al igual que el grupo de Vildozola y cols (1 hora), a diferencia del trabajo de Magnaval y cols que emplean 18 horas en esta reacción; estas diferencias nos indican que tanto para las diferentes etapas de cada prueba, el tiempo general transcurre entre las 24 a 48 horas de prueba, sin contar con el pegado de antígeno (18 horas). Con respecto al tiempo empleado para el sustrato difiere

considerablemente debido al reactivo usado, en ELISA se utilizó la tetrametilbencidina (TMB) en el grupo de Atta, mientras que en el grupo de Vildozola se utilizó la o-fenilnadiamina dihidroclorada (OPD), dando tiempos en ambos grupos de hasta 30 minutos, mientras que para el Dot-ELISA se empleó la diaminobencidina (DAB), brindando un tiempo de 5 minutos para el revelado.

Para alcanzar los valores de la prueba se logró estandarizar la técnica de Dot-ELISA mediante la concentración del antígeno, la dilución del conjugado al igual que la dilución del suero óptimo, que se observan en las figuras N°7 y N°8; donde comparando las 3 figuras se presenta una mejor reacción de color cuando se trabaja con una dilución del conjugado 1/500, a diferencia del trabajo de Vildozola y cols donde emplearon un conjugado diluido 1/4000; la dilución del suero fue de 1/10, el cual coincidió con el grupo de Atta, el grupo de Vildozola realizó la dilución 1/20, presentando otra diferencia; la concentración de antígeno óptimo se ubica en 10 mg/dL. La variación de los colores de la técnica estandarizada se observó en las diluciones de conjugados 1/1000 y 1/2000 pertenecientes a la figura N°8 donde el color es tenue.

Los sueros positivos utilizados para encontrar la sensibilidad de la prueba, fueron determinados como tales con la técnica de Inmuno-electro-transferencia Blot (EITB) descrita por el grupo de Roldán y Espinoza, el cual presenta buena sensibilidad (100%), especificidad (96%), la cual al hacer una comparación con la técnica de ELISA IgG brinda confiabilidad para considerar esos sueros almacenados como positivos para *Toxocara*.⁽⁶³⁾ Adicional a ello en estos pacientes que resultaron positivos había presencia de eosinofilia; estos sueros utilizados fueron 40 de los cuales a la técnica EITB eran representados mediante cruces a su positividad, por ello se trabajó con los sueros que tenían entre dos y tres cruces (siendo esta cantidad de cruces las más altas). Tomando en cuenta los sueros empleados descritos por la técnica del grupo de Roldan y Espinoza, nuestra prueba presenta una sensibilidad y especificidad del 97.5% siendo estas de altos valores; comparando estos resultados obtenidos en la estandarización con los trabajos de Magnaval y cols, donde su prueba presentaba valores moderados de sensibilidad y especificidad, dependiendo del punto de corte, pero en ningún punto de corte que plantearon lograron alcanzar ambos

valores altos, porque se mejoraba o la sensibilidad o la especificada pero no ambos en sus prueba de ELISA IgE. En cambio, en el trabajo de Atta y cols, presentaron una sensibilidad del 95% y con la especificad del 100% solo después de usar el RF-Absorbent, determinando de esta forma que el reactivo para bloquear las uniones de los anticuerpos IgG, aumentaba el rendimiento de la prueba.

Los sueros utilizados de otras parasitosis que resultaron positivas descritos en la Tabla N° 4 y Figura N°10, no se descarta que también presenten una doble infección junto con *Toxocara*, debido a que los sueros que resultaron positivos fueron aquellos que presentaban infección con Chagas (n=2) y *Leishmania* (n=2), por ello, siendo pocos sueros que reaccionaron de forma positiva (4 de 160), nos indicaría más la doble infección parasitaria, cada una de estas muestras se consiguió luego de haber realizado un examen directo en cada persona, además, estas parasitosis son provocadas por protozoos, que no guardan alguna relación con los helmintos, con ello, nos minimiza la posibilidad de señalar una reacción cruzada por la similitud de las especies.

La técnica estandarizada en este trabajo sigue un marco teórico y práctico, debido a que en estudios realizados previamente descubren que las relaciones de los síntomas y signos están congruentes con la infección en la mayoría de los casos, pero se busca con esta prueba que la relación de los síntomas y signos con la infección pueda ser del 100% para evitar tratamientos de personas diagnosticadas como falsas positivas. Entre estos signos se ha estado hablando acerca de la eosinofilia, y es debido, a que el incremento de los eosinófilos como defensa ante alguna infección alérgica están mediadas por la acción de la IgE, siendo esta inmunoglobulina específica para las infecciones parasitarias especialmente en helmintos, conociendo esa relación es que se realizó estudios para comprobar esta teoría, como trabajos realizados por: el grupo de Grecco, donde observan la infección con *Toxocara* y la alergia ⁽¹⁷⁾, trabajo de Roldán y cols, donde determina la eosinofilia y los riesgos asociados a la Toxocariosis en población de niños ⁽²⁵⁾, al igual en los resultados encontrados por el grupo de Guilherme y cols, donde dos de los niños que presentaban anticuerpos IgG presentaban una eosinofilia moderada, relacionada por la clínica de los pacientes ⁽⁶⁴⁾, un estudio por Artinyan y cols, acerca de la búsqueda de anticuerpos anti-*Toxocara*

en pacientes con eosinofilia ⁽⁶⁵⁾, nos da a conocer que en su mayoría hay un incremento de anticuerpos IgE; diferente del caso de Inchaupé y cols que dan a conocer que la cantidad de larva migrans en el organismo humano son un factor importante al momento de producir anticuerpos IgE, ya que, en su estudio que realizaron sobre Toxocariasis ocular por lo general solo es una sola larva en el ojo y no genera un incremento de anticuerpos en el suero, pero si se puede obtener un incremento aunque no tan significativo en una muestra de humor vítreo ⁽⁶⁶⁾. Por lo tanto, esta técnica con muestras de sueros nos permite determinar si los anticuerpos son específicos para *Toxocara* y deja la oportunidad a realizar estudios posteriores, el evaluar la técnica con otros tipos de muestras extraídas (como humor vítreo) para aportar en el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad con un costo bajo como en el trabajo de Vildozola y cols.⁽¹⁴⁾

Cada parte del proceso se siguió con los debidos cuidados, para evitar alguna contaminación externa, los tiempos fueron precisos, al igual que la medición de las diluciones, se realizó el correcto almacenamiento de las muestras y los reactivos. La parte estadística del procedimiento fue mediante los valores encontrados para la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (tanto positivo como negativo). La gráfica N°5 expuesta, nos brinda en detalle como la cantidad de las muestras evaluadas puede significar en la obtención de los valores al momento de realizar la estadística, sin embargo, cabe resaltar que la prueba si es un éxito y se espera se continúe en trabajos posteriores para más aporte en el diagnóstico de esta u otras infecciones. En base a las buenas prácticas para la investigación se consiguió cada documento necesario para la formación de este trabajo y como no se requirió de la participación de personas, no se presentó riesgos o reacciones secundarias de alguna índole.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Según el presente estudio se ha logrado estandarizar un Dot-ELISA y determinar anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis Humana, siendo una prueba capaz de poder adaptarse a la realidad del país donde nos encontramos, Perú. La utilización de la prueba puede llegar hasta zonas aisladas, alejadas, sectorizadas y/o con bajos recursos económicos o donde la atención para la determinación de estas infecciones sea deficiente.

Como resultado de la estandarización se encontró los parámetros necesarios de la prueba, como la dilución del antígeno necesario, siendo 10 mg/dL; la dilución del suero tratado con el Rf-Absorbent, se definió en 1/10 dils, durante un tiempo de 18 a 24 horas, al igual que el tiempo empleado en la reacción antígeno-anticuerpo (18 a 24 horas); la concentración diluida del conjugado necesario para la reacción fue de 1/500 dils, por un tiempo de 180 minutos; por último la solución reveladora (sustrato-cromógeno) empleada, diaminobencidina (DAB), consistió en un preparado de 10 mL de buffer citrato, 100 uL de DAB, 10 uL de peróxido de hidrógeno, por un tiempo de 5 minutos. Sin olvidar que luego del tiempo en la reacción antígeno-anticuerpo y al tratar con el conjugado se debe de realizar entre 2 a 3 lavados de las tiras para quitar el excedente de cada sustancia por un tiempo de 5 minutos.

La muestra de suero necesaria para la prueba no precisa de un procedimiento difícil; además no requiere instrumentos especializados como la prueba de ELISA o de Western Blot, los equipos necesarios para el procedimiento son; una refrigeradora que presente una temperatura de 4°C y de una incubadora que se pueda programar a 37°C (dependiendo de la zona donde se realice la prueba, si el calor es mayor se puede trabajar a temperatura de ese ambiente). Adicional a ello el uso del reactivo Rf-Absorbent minimiza los costos de la prueba y brinda resultados significativos, produciendo una sensibilidad de 97.50% y especificidad de 97.50%, siendo valores altos por su proximidad al 100%.

El cuerpo humano es todo un mundo distinto en cada persona, puede reaccionar de diferentes maneras ante un mismo problema, es por ello que se presenta algunas restricciones para la prueba (como una mínima cantidad de anticuerpos IgE producidos por la infección de la larva en el organismo), que son casos poco frecuentes, aun así, la prueba con su valor predictivo negativo de 99.36% brinda de forma casi certera la identificación de personas que realmente no presentan los anticuerpos específicos contra la larva migrans y con un valor predictivo positivo de 90.69%, siendo este también alto, establece una ayuda para la identificación de las personas que realmente presentan la infección.

5.2. RECOMENDACIONES

En el presente estudio se han encontrado algunos inconvenientes que se resolvieron con la estandarización, por ello el obviarlos puede recalcar alguna incongruencia en el proceso, debido a eso se recomienda:

Al momento de preparar las tiras con el respectivo antígeno, asegurarse que la gota vertida en el papel de nitrocelulosa sea de forma homogénea sin presentar gotas de aire u ondas por el movimiento de la pipeta, porque causaría problemas en la lectura final de la prueba.

El uso del reactivo para la preparación del suero ha demostrado ser eficiente para la prueba, fácil de realizar y sobre todo económico, el obviarlo requerirá de una nueva estandarización con otra metodología, ya que se debe de tener en cuenta las posibles reacciones falsas positivas o negativas causadas por el exceso de anticuerpos IgG.

Mantener las tiras preparadas de nitrocelulosa húmedas durante la incubación a 37°C, la evaporación debido al tiempo prolongado puede conllevar resultados imprecisos.

En cada etapa de la prueba se determinó el tiempo y la dilución mínima necesaria donde los resultados brindaban buena información del proceso, por ello el no tenerlo en cuenta afectará el rendimiento de la prueba.

En la detección de la IgE, se observó un comportamiento peculiar, ya que dicho anticuerpo en la fase de reacción antígeno-anticuerpo, se presentó mejores resultados a temperatura ambiente (aproximadamente entre 20 y 22 °C) y a 37 °C, esto nos presentaría en la posibilidad de mejoras en la prueba y más conocimiento acerca de este anticuerpo. Cabe resaltar que el estudio se mantiene abierto a diferentes trabajos futuros como es el caso de tratar la prueba a una temperatura ambiente debidamente medida, en caso no se cuente con una incubadora graduada.

Por ser un trabajo prospectivo, aún hay varios temas a tratar con esta prueba para mejorarla o llevarla a un siguiente nivel de producción, que ayude y alcance a personas que la necesiten, por ejemplo, algunos posibles trabajos podrían ser: realizar un estudio en una población que se tenga sospecha de dicha infección, con ello observar las ventajas y deficiencias en la prueba (realizando un respectivo Procedimiento operativo estandarizado - POE, para su implementación en el laboratorio), lo cual aumentaría el rendimiento de la prueba; se puede realizar una comparación de técnicas que se encarguen de detectar la IgE, como puede ser alguna otra prueba que ya se esté comercializando como con el ELISA IgE total que normalmente se emplea, aunque por ser costosa e imprecisa, no es una opción muy frecuente entre los pedidos de pruebas para esta infección; una investigación acerca de la relación del uso de un hemograma junto con la prueba estandarizada, observando si el incremento de los eosinófilos repercutiría en alguna significancia con el incremento de la IgE; realizar una nueva estandarización empleando diferentes reactivos o métodos, para reducir los tiempos que se han encontrado o para que la prueba ya no sea solo cualitativa sino también se pueda realizar de forma semicuantitativa o cuantitativa, llevando a más posibilidades como el estudio de la reducción de anticuerpos IgE durante el tiempo o tratamiento de la infección; entre otros trabajos que serán de ayuda a futuro para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Breña J, Hernández R, Hernández A, Castañeda R, Espinoza Y, Roldán W, et al. Toxocariosis humana en el Perú; Aspecto epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. **Act Med Per.** 2011; 28(4), p.228-236.
- 2- Díaz A, Pulido M, Giraldo J. Nemátodos con potencial zoonótico en parques públicos de la ciudad de Tunja, Colombia. **Sal Pub Méx.** 2015; 57(2), p.170-176.
- 3- Espinoza Y, Vildozola H, Jiménez S, Roldan W, Huapaya P, Villar C, et al. Prevalencia estimada de Toxocariosis humana en la región de Lima. **An Fac Med.** 2016; 77(1), p.21-24.
- 4- Rodriguez C, Chieffi P, Lescano A, Ourique de Melo E, Fux B, Cury C. Frequency and risk factors for Toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. **Rev Inst Med Trop S. Paulo.** 2006; 48(5), p.251-255.
- 5- De los Ángeles M, Bojamich V, Jacobacci M, Sercic C, Michelin A, Alonso M. *Toxocara canis* y asma bronquial. **MEDICINA (Buenos Aires).** 2010, 70(1), p.75-78.
- 6- Lee M, Moore B, Bottazzi E, Hotez J. Toxocariasis in North America: A systematic review. **Plos Negl Trop Dis.** 2014; 8(8), p.e3114.
- 7- Kaneva E, Rainova I, Harizanov R, Nikilov G, Kaftandjiev R, Nikolov G, Kaftandjiev I, Mineva I. Study of *Toxocara* seroprevalence among patients with allergy and healthy individuals in Bulgaria. **Parasite Immunol.** 2015; 37, p.505-509.
- 8- Van Den Broucke S, Kanobana K, Polman K, Soentjens P, Vekemans M, Theunissen C, et al. Toxocariasis diagnosed in international travelers at the institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, from 2000 to 2013. **Plos Negl Trop Dis.** 2015; 9(3), p.1-15.
- 9- Wei C, Xiao Z, Na Z, Chang Y, Jia C, Xiang W, Bing L, et al. Toxocara seroprevalence among clinically healthy individuals, pregnant women and psychiatric patients and associated risk factors in Shandong province, Eastern China. **Plos Negl Trop Dis.** 2014; 8(8), p.e3082.

- 10- Espinoza Y, Huapaya P, Roldán W, Jiménez S, Arce Z, Lopez E. Clinical and serological evidence of *Toxocara* infection in school children from Morrope district, Lambayeque, Peru. **Rev Inst Med Trop S. Paulo.** 2008; 50(2), p.101-105.
- 11- Terrones C, Andrade T, Lachira A, Valladolid O, Lanata C. Toxocariosis atípica: reporte de un caso en la costa norte del Perú. **Rev Per Med Exp Sal Pub.** 2010; 27(1), p.138–141.
- 12- Roldán W, Espinoza Y, Huapaya P, Jiménez S. Diagnóstico de la Toxocariosis Humana. **Rev Per Med Exp Sal Pub.** 2010; 27(4), p.613-620.
- 13- Vildozola H, Espinoza I, Roldán W. Estandarización de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgE en pacientes con equinocosis quística y su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes tratados con Albendazol: reporte preliminar. **An Fac Med.** 2012; 73(1), p.35-41.
- 14- Vildozola H, Espinoza I, Roldán W, Jiménez S, Nicho M, Mendoza G, et al. Seguimiento mediante prueba de ELISA para anticuerpos IgE de pacientes con equinocosis quística tratados con Albendazol. **An Fac Med.** 2015; 76(3), p.241–246.
- 15- Mika C, Poncio R, Pardini A. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for Paracoccidioides brasiliensis antibody detection. **Jou Ven Ani Trop Des.** 2017; 23, p.11.
- 16- Wang Y, Ye Z, Ying Y. Detection of immunoglobulin E using an aptamer based Dot-Blot assay. **Chinese Science Bulletin.** 2013; 58(24), p.2938-2943.
- 17- Grecco M, Regina S, Aparecida C, Garcia E, Afonso A, Monnazzi G, et al. Toxocara canis and the allergy process. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2015; 110(6), p.726-731.
- 18- Qualizza R, Megali R, Incorvaia C. Toxocariasis resulting in seeming allergy (case report). **Iran J Allergy Asthma Immunol.** 2009; 8(3), p.161-164.
- 19- Svobodova Z, Jankovicova B, Horak D, Bilkova Z. Dot-ELISA affinity test: An easy, low-cost method to estimate binding activity of monoclonal antibodies. **J Anal Bioanal Tech.** 2013; 4(3), p.168.
- 20- Cornejo E. Frecuencia de anticuerpos anti-*Toxocara canis* detectados mediante la prueba Dot-ELISA en pacientes que acudieron al instituto de Medicina

- Tropical “Daniel A. Carrión” durante el periodo 2006-2008. (TESIS). Lima: **Cybertesis UNMSM**, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.2009, Perú, p.53
- 21-Roldán W, Espinoza Y, Huapaya P, Huiza A, Sevilla C, Jiménez S. Frequency of human Toxocariosis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by Dot-ELISA test. **Rev Inst Med Trop S. Paulo**. 2009; 51(2), p.67-71.
 - 22-Pappas M. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. **Vet Par**.1988; 29, p.105-129.
 - 23-Anunobi J, Okoye C, Nwosu G. Toxocariasis and public health: An epidemiological review. **Glob J Infect Dis Clin Res**. 2017; 3(1), p.028-039.
 - 24-Huapaya P, Espinoza Y, Roldán W, Jiménez S. Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública? **An. Fac. Med.** 2009; 70(4), p.283-90.
 - 25-Joon A, Joon W, Jin Y, Chang Y, Wan T, Ahn J, et al. Clinical Features and Course of Ocular Toxocariasis in Adults. **Plos Negl Trop Dis**. 2014; 8(6), p.e2938.
 - 26-Choi D, Lin J, Choi C, Paik S, Kim S, Huh S. Toxocariosis and ingestion of raw cow liver in patients with eosinophilia. **Korean J Parasitol**. 2008; 46(3), p.139-143.
 - 27-Roldán W, Espinoza Y, Atúncar A, Ortega E, Martinez A, Saravia M. Frequency of eosinophilia and risk factors and their association with *Toxocara* infection in schoolchildren during a health survey in the north of Lima, Peru. **Rev Inst Med Trop S. Paulo**. 2008; 50(5), p.273-278.
 - 28-Pak K, Park S, Byon I, Lee J. Ocular Toxocariasis presenting as bilateral scleritis with suspect retinal granuloma in the nerve fiber layer: a case report. **BMC Infect Dis**. 2016; 16, p.426.
 - 29-Lum F, Hoskins J, Moorthy R, Read R, Starr M, Montgomery S, et al. Ocular Toxocariasis – United State, 2009-2010.**MMWR**. 2011; 60(22), p.734-737.
 - 30-Ramírez J, Falcón N, Serrano E. Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara sp.* en ambientes internos de Instituciones Educativas Estatales de los distritos del cono Norte de Lima. **Salud Tecnol Vet**. 2014; 2, p.78-82

- 31- Anacleto L, Falcón N, Roldán W, Noé N, Espinoza Y. La práctica veterinaria con caninos domésticos como factor de riesgo para la exposición a *Toxocara canis* en Lima, Perú. **Rev Inv Vet Perú**. 2015; 26(3), p.484-488.
- 32- OIE. Capítulo 1.4: Vigilancia sanitaria de los animales terrestres. Monique Eloit. Normas: Código sanitario para animales terrestres. Francia, 2018. **Disponible en:** <http://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre/acceso-en-linea/>
- 33- Torres M, López J, Solari V, Jofré L, Abarca K, Perrot C. Recomendaciones para el cuidado y manejo responsable de mascotas y su impacto en salud humana. **Comité de infecciones emergentes**, Sociedad Chilena de Infectología. 2014; p.18.
- 34- OIE. Capítulo 7.7: Control de las poblaciones de perros vagabundos. Monique Eloit. Normas: Código sanitario para animales terrestres. Francia, 2018. **Disponible en:** <http://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre/acceso-en-linea/>
- 35- Muñoz M, Alba F. Antígenos de secreción-excreción de *Toxocara canis* reconocidos por cachorros del área metropolitana de la ciudad de México. **Vet Méx**. 2010; 41(1), p.59-63
- 36- González G, Alba F, Garcia C, Argüello R. Proteinases in Excretory-Secretory Products of *Toxocara canis* Second Stage Larvae: Zymography and Modeling Insights. **Bio Med Res Inter**. 2014; p.1-9
- 37- Divyamol T, Jeyathilakan N, Basith A, Senthilkumar M. In vitro production of *Toxocara canis* excretory-secretory (TES) antigen. **J Parasitol Dis**. 2016; 40(3), p.1038–1043.
- 38- RPMI medium: Product information. Sigma-Aldrich. No R7130. **Available from:** <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/5/r7130dat.pdf>
- 39- Marín F, Castaño J. Establecimiento de una línea celular primaria a partir de huevos con embrión de *Toxocara canis*. **Infectio**. 2011; 15(3), p.184–190.
- 40- Paul W. Section III: Immunoglobulins and B-Lymphocytes; Chapter 5: Immunoglobulins: Structure and Function. Fundamental Immunology. **Wolkers Kluwer:** Lippincott: Williams and Wilkins. Seventh Edition, 2012.
- 41- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. Part I: Chapter 3: Antibodies. Immunology. **ELSEVIER**. Eighth Edition, 2012.

- 42-Parham P. Chapter 9: Immunity mediated by B-cells and Antibodies. The Immune System. **Garland Science**: Taylor and Francis Group, LLC. Fourth Edition, 2015.
- 43-Murphy K, Weaver C. Part II: Chapter 4: Antigen recognition by B-cell and T-cell receptors. Janeway's Immunology. **Garland Science**: Taylor and Francis Group, LLC. Ninth Edition, 2016.
- 44-Murphy K, Weaver C. Part IV: Chapter 10: The Humoral Immune Response B-cell activation by Antigen and helper T-cell. Janeway's Immunology. **Garland Science**: Taylor and Francis Group, LLC. Ninth Edition, 2016.
- 45-Nagoba B, Pichare A. Unit II: Chapter 18: Immunoglobulins-Antibodies. Medical Microbiology and Parasitology: Prep. Manual for Undergraduates. **ELSEVIER**. Third Edition, 2016.
- 46- Abbas A, Litchman A, Pillai S. Chapter 5: Antibodies and Antigens. Cellular and Molecular Immunology. **ELSEVIER**. Ninth Edition, 2017.
- 47-Turgeon M. Part I: Basic Immune Mechanisms; Chapter 2: Antigens and Antibodies. Immunology and Serology in Laboratory Medicine. **ELSEVIER**. Sixth Edition, 2017.
- 48- Abbas A, Litchman A, Pillai S. Chapter 7: Humoral Immune Responses. Basic Immunology: Fundamental and Disorders of the Immune System. **ELSEVIER**. Sixth Edition, 2019.
- 49-Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. Part I: Chapter 15: Immunity to protozoa and worms. Immunology. **ELSEVIER**. Eighth Edition, 2012.
- 50-Paul W. Section VII: Immunity to infections agents; Chapter 38: Immune response to parasites. Fundamental Immunology. **Wolters Kluwer**: Lippincott: Williams and Wilkins. Seventh Edition, 2012.
- 51- Abbas A, Litchman A, Pillai S. Chapter 16: immunity to microbes. Cellular and Molecular Immunology. **ELSEVIER**. Ninth Edition, 2017.
- 52- Abbas A, Litchman A, Pillai S. Chapter 19: Hypersensitivity disorders. Cellular and Molecular Immunology. **ELSEVIER**. Ninth Edition, 2017.
- 53- Code of good practice for standardization. Guide 59. ISO. 1994; 1, p.5
- 54- ISO/IEC. Standardization and related activities-general vocabulary. Guide 2. 2004; 2, p.59.

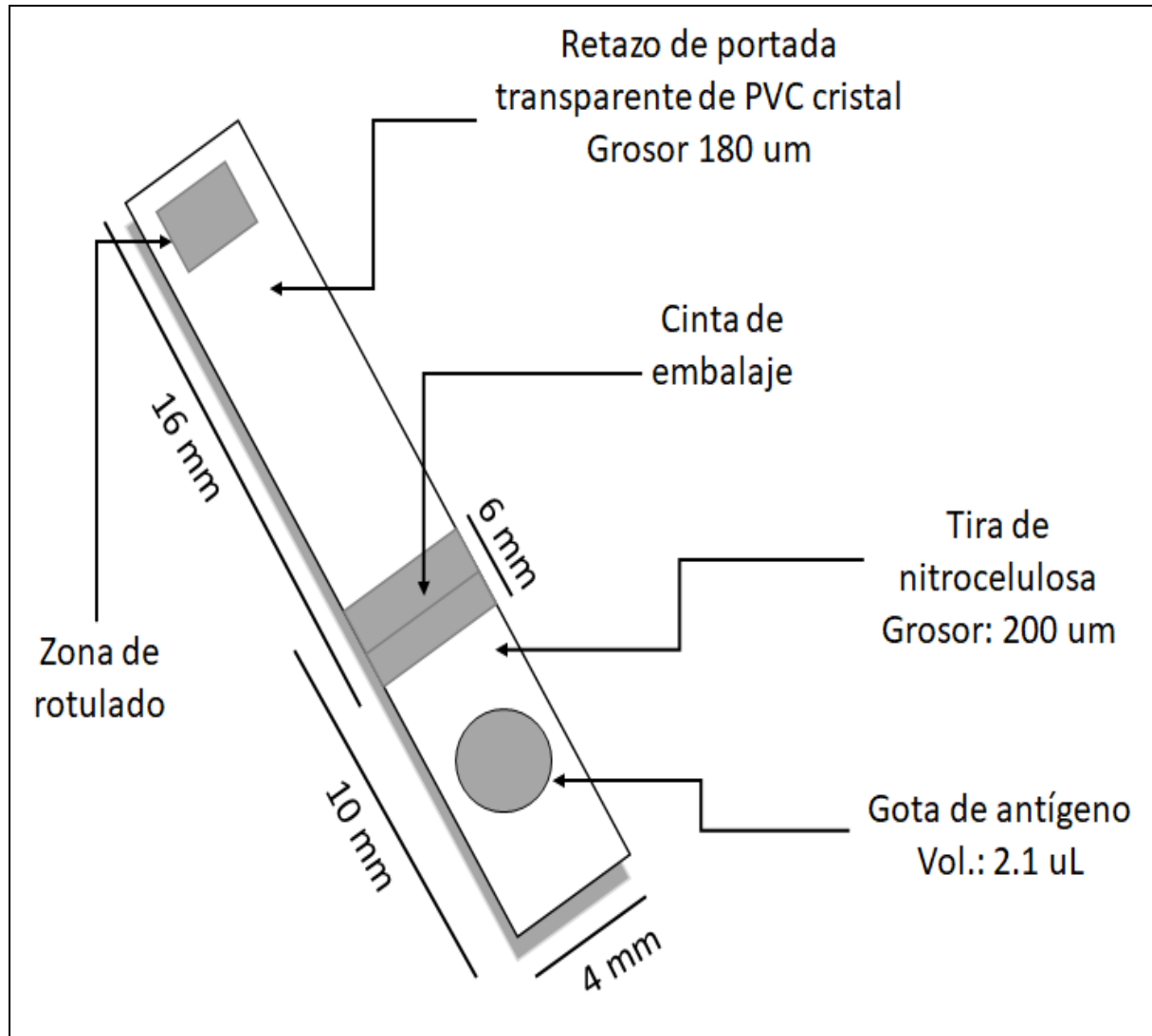
- 55- Manufactured for Immuno-Biological Laboratories Inc. IBL-America-Rf-Absorbent. IBL-America. **Available from:** <https://ibl-america.com/pdf/reagents/IB79001.pdf>
- 56- Fitzgerald. RF Absorbent. Fitzgerald industries international. **Available from:** <https://www.fitzgerald-fii.com/rf-adsorbent-85r-1007.html>
- 57- Zhang C, Cha R, Yang L, Mou K, Jiang X. Fabrication of cellulose/grapheme paper as a stablecy cling anode materials without collector, Carbohydrate Polymers. 2010, **Available from:** <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.046>
- 58- Fahmy Y, El W, El G, Abou Z, Youssefb M. Plant proteins as binders in cellulosic paper composites. **Inter J Biol Macrom.** 2010; 47, p.82-85
- 59- DAB enhanced liquid substrate system for immunohistochemistry. Sigma-Aldrich. 2002. **Available from:** <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/3/d3939dat.pdf>
- 60- Hernández B, Gonzales C. conjugados anticuerpos-farmaco: el estado del arte. **Rev Méx Cienc Farm.** 2011; 42(3), p.16
- 61- Magnaval J, Fabre R, Maurières P, Charlot J, Larrard B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and posttreatment follow-up of Human Toxocariasis. **J Clin Microbiol.** 1992; 30(9), p.2269-2274.
- 62- Atta S, Araújo, Oliveira J, Riberiro J, Almeida, Carvalho. Detection of specific IgE antibodies in parasites diseases. **Braz J Med Biol Res.** 1999; 32(9), p.1101-1105.
- 63- Roldán W, Espinoza Y. Evaluation of an enzyme-linked Immunoelctrotransfer Blot-test for the confirmatory serodiagnosis of human Toxocariosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2009, 104(3), p.411-418.
- 64- Guilherme E, Marchioro A, Araujo S, Falavigna D, Adami C, Guilherme G, et.al. Toxocariasis in children attending a public health service pneumology unit in Paraná state, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2013; 55(3), p.189-192.
- 65- Artinyan E, Kukoyun V, Akgul O, Altiparmark S, Oner Y. Research on *Toxocara canis* antibodies obtained from patients with eosinophilia. **Indian J Med Microbiol.** 2014; 32(4), p.383-386.

66-Inchaupe S, Echandi L, Dodds E. Diagnóstico de Toxocariasis ocular mediante la demostración de anticuerpos en el humor vítreo. **Arch Soc Esp Oftalmol.** 2018; 93(5), p.220-224

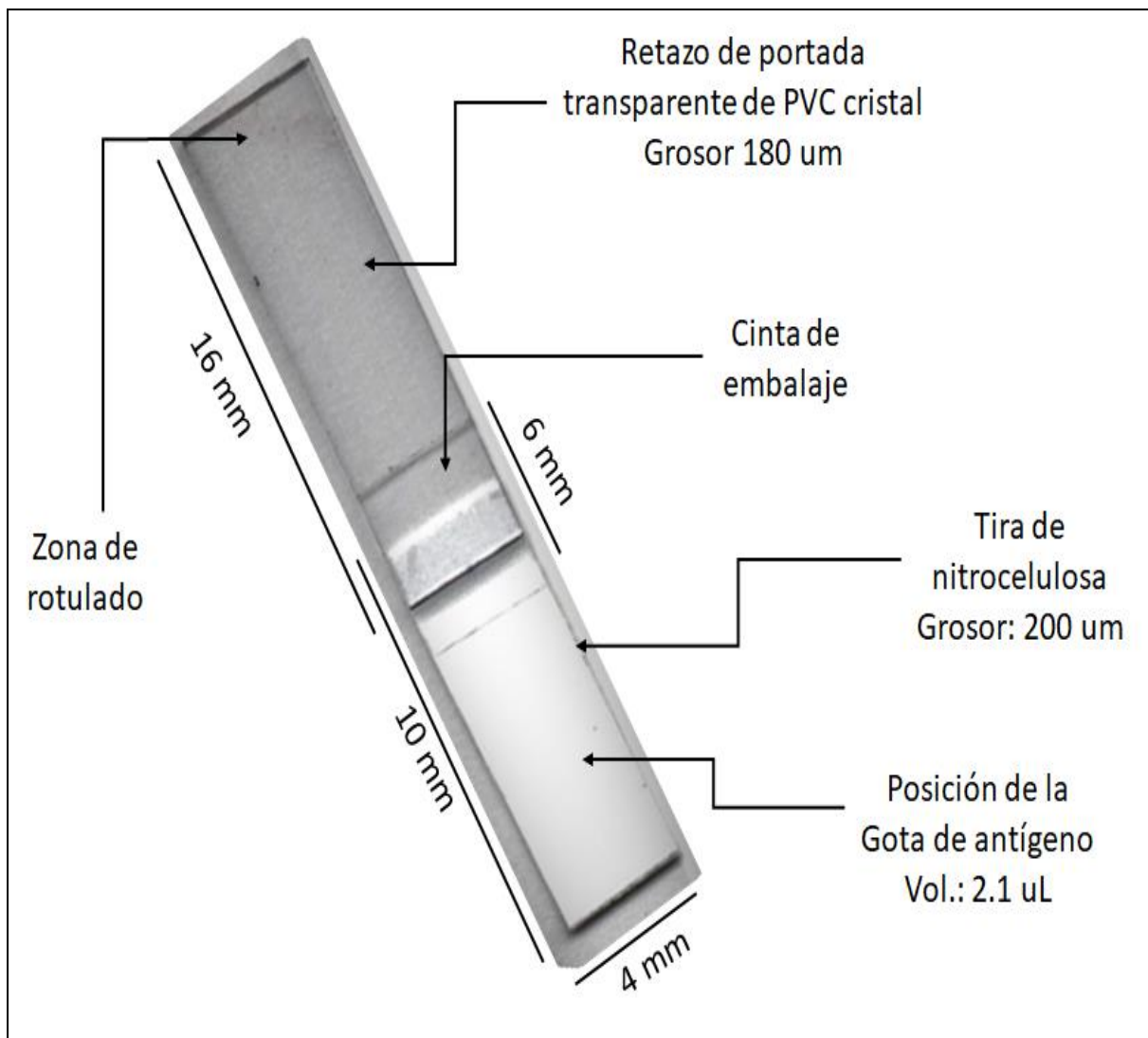
ANEXOS

ANEXOS

ANEXO N° 01: Composición de las tiras reactivas utilizadas en la estandarización.



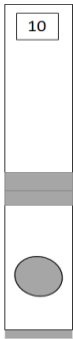














Composición de las tiras reactivas. (Diseño real)



ANEXOS

ANEXO N° 02: Plan de trabajo para la estandarización (parte 1)

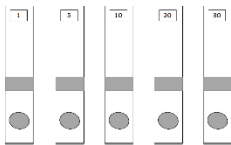
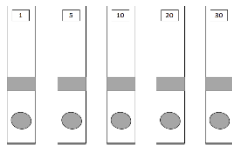
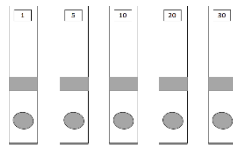
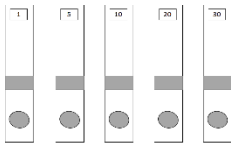
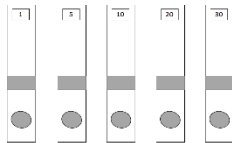
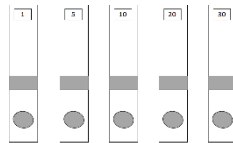
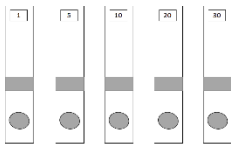
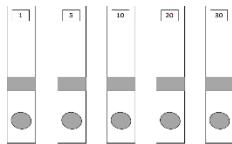
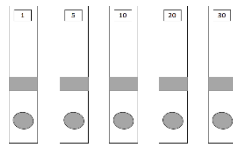
Preparación de tiras	Preparación de las tiras reactivas (considerando las medidas ya descritas, al igual que el antígeno correspondiente); luego llevar a bloquear, pasado el tiempo secar y dejar listo para el uso.														
Tratado del suero	Para alistar el suero correctamente se trabajó con el RF-absorbent en dos tiempos como indicaba el inserto de 15 min o de 18 a 24 horas.														
Temperatura de trabajo	4 °C					TA* °C					37 °C				
Esquema															
Tiempo de incubación	Para todas las condiciones hasta este punto, se trabajara con un tiempo de 45, 90, 180 minutos y de 18 a 24 horas.														
Lavados	Luego del tiempo correspondiente, se realizara de 2 a 3 lavados.														

NOTA: Para cada concentración de antígeno designada en las diferentes temperaturas se trabaja por triplicado (x3). Por ello el número total de trabajo será de 180 tiras.

*TA = Temperatura ambiente, aproximadamente entre 18 y 22 °C


ANEXOS

ANEXO N° 03: Plan de trabajo para la estandarización (parte 2)

Preparación de tiras		Luego de tiempo de incubación, de lavado, se proseguirá a evaluar las condiciones del conjugado, por lo cual, se ha estado trabajando por triplicado (x3) cada tira en su temperatura dada. Por ejemplo: las tiras incubadas a 37 °C serán divididas para cada temperatura de trabajo		
Temperatura para el conjugado		Las temperaturas dadas para cada tira luego de la primera incubación serán las siguientes		
		4 °C	TA °C	37 °C
Esquema	Tiras a 4 °C			
	Tiras a TA °C			
	Tiras a 37 °C			
Tiempo para el conjugado		Para todas las condiciones hasta este punto, se trabajara con un tiempo de 45, 90 y 180 min		
Lavado y secado		Luego del tiempo correspondiente, se realizara de 2 a 3 lavados, aplicar la solución reveladora y luego del tiempo estimado, dejar secar al medio ambiente.		


ANEXOS

ANEXO N° 04: Resolución de Decanato para la aprobación del proyecto de tesis.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA

« Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional »
« Año del Centenario del Museo de Historia Natural y de la Revista Anales de la Facultad de Medicina »



06 AGO 2018

RECEBIDO

Mar

Lima, 31 de julio de 2018

RESOLUCIÓN DE DECANATO N° 1906-D-FM-2018

Visto el Expediente N° 13279-FM-2018 de fecha 31 de julio de 2018 de la Unidad de Trámite Documentario y Archivo de la Facultad de Medicina, sobre aprobación de Proyectos de Tesis.

CONSIDERANDO:

Que, mediante Resolución de Decanato N° 1569-D-FM-2013 ratificada con Resolución Rectoral N° 01717-R-2016 de fecha 19 de abril de 2016, se aprueba el Reglamento para la Elaboración de Tesis para optar el Título Profesional en las Escuelas Académico Profesionales de la Facultad de Medicina, que en su **Capítulo I. Introducción, Art. 2:** establece que: *"La tesis debe ser un trabajo inédito de aporte original, por la cual se espera que los estudiantes adquieran destrezas y conocimientos que los habiliten para utilizar la investigación como un instrumento de cambio, cualquiera sea el campo del desempeño"* así mismo, en su **Capítulo VI: Del Asesoramiento de la tesis: Art. 28** establece que: *"La Dirección de la EAP con la opinión favorable del Comité de Investigación, solicitará a la Dirección Académica la Resolución Decanal respectiva para proceder a su ejecución"*;


Que, mediante Oficios N° 1582-1584/FM-EPTM/2018 el Director (e) de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, informa que los Proyectos de Tesis que figuran en la propuesta cuentan con opinión favorable de la Comisión de Investigación de la citada Escuela para su ejecución, y;

Estando a lo establecido por el Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y las atribuciones conferidas por la Ley Universitaria N° 30220;

SE RESUELVE:


1º Aprobar los Proyectos de Tesis, según detalle:

Estudiante: Ronald Enrique Santivañez Ramos Cód. 14010534 E.P. Tecnología Médica Área: Terapia Ocupacional	Título del Proyecto de Tesis: "RUTINAS OCUPACIONALES DE USUARIOS POST INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO CON EVOLUCIÓN DE DOS A CUATRO AÑOS DEL HOSPITAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN - LIMA 2018"
Asesor: Lic. Mc Anthony Caviedes Polo Código Docente: 0A2239	
Estudiante: Roberto Antonio Rojas Arca Cód. 13010538 E.P. Tecnología Médica Área: Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica	Título del Proyecto de Tesis: "ESTANDARIZACIÓN DE UN DOT-ELISA Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS HUMANA"
Asesora: Blg. Irma Adalberto Espinoza Blanco Código Docente: 023647	




Av. Grau 755 - Lima I. Apartado Postal 529 - Lima 100 - Perú Telf (511) 3283229 - (511) 3283238
Web: www.medicina.unmsm.edu.pe

ANEXOS

 **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
(Universidad del Perú DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA

« Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional »
« Año del Centenario del Museo de Historia Natural y de la Revista Anales de la Facultad de Medicina »

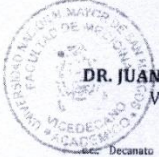



...//

Cont. RESOLUCIÓN DE DECANATO N° 1906-D-FM-2018

2º Encargar a la Escuela Profesional de Tecnología Médica el cumplimiento de la presente resolución.

Regístrese, comuníquese, archívese.

 **DR. JUAN PEDRO MATZUMURA KASANO**
Vicedecano Académico (e)

 **DR. SERGIO GARCERANOS MEDRANO**
Decano

Decanato
EPTM
Interesados

/vin

Av. Grau 755 - Lima 1. Apartado Postal 529 - Lima 100 - Perú Telf. (511) 3283229 - (511) 3283238
Web: www.medicina.unmsm.edu.pe

ANEXOS

ANEXO N° 05: Solicitud enviada para el ingreso al Instituto de Medicina Tropical



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad de Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA
E. P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA



Lima, 01 de Agosto del 2018

Sr(a). Blgo.

IRMA ADALBERTA ESPINOZA BLANCO

Jefe Sección de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical
UNMSM

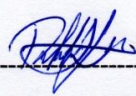
SOLICITUD: PERMISO PARA PODER REALIZAR EL TRABAJO DE TESIS
EN LOS LABORATORIOS DE LA SECCIÓN CIENTÍFICA DE
PARASITOLOGÍA DEL INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

Presente:

Tengo el agrado de dirigirme a usted para expresarle un saludo cordial y a la vez solicitarle el permiso correspondiente para la ejecución de mi trabajo de tesis "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana" en el laboratorio de la sección Científica de parasitología del Instituto de Medicina Tropical en el año 2018.

Por su favorable atención, reciba mi agradecimiento.

Atentamente



Rojas Arca, Roberto Antonio

ANEXOS

ANEXO N° 06: Respuesta del Jefe de la Sección Científica de Parasitología para el ingreso al Instituto de Medicina Tropical



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad de Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DANIEL A. CARRION



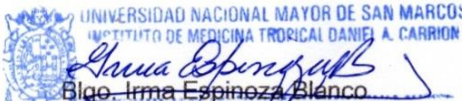
Lima, 02 de Agosto del 2018

Sr
ROBERTO ROJAS ARCA
Alumno de Tecnología Médica
U.N.M.S.M.

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a Usted para saludarlo muy cordialmente e informarle que se ha autorizado el ingreso del Alumno de la E. P. Tecnología Médica del Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica: **ROBERTO ROJAS ARCA** para la ejecución del trabajo de tesis "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana" a realizarse en la Sección Científica de Parasitología del I. M. T. en el año 2018.

Atentamente


Bigo. Irma Espinoza Blanco
Jefe de la Sección de Parasitología
I.M.T. D.A. Carrión

ANEXOS

ANEXO N° 07: Respuesta de la Directora del Instituto de Medicina Tropical para el ingreso al Instituto de Medicina Tropical



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad de Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DANIEL A. CARRION



Lima, 02 de Agosto del 2018

Sra. Blgo

IRMA ADALBERTA. ESPINOZA BLANCO

Jefe Sección de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical

Facultad de Medicina

U.N.M.S.M.

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a Usted para saludarla muy cordialmente y en mi calidad de Directora del I.M.T. "D.A. Carrión" autorizo el ingreso del Sr. **ROBERTO ROJAS ARCA** para la elaboración del trabajo de tesis "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana" a realizarse en la Sección Científica de Parasitología del I.M.T. en el año 2018.

Atentamente


Dra. VILMA BEJAR CASTILLO

Directora del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión.

Facultad de Medicina

U.N.M.S.M.



ANEXOS

ANEXO N° 08: Solicitud enviada para el uso de los sueros en estudio



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad de Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA
E. P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA



Lima, 02 de Agosto del 2018

Sr(a). Blgo

IRMA ADALBERTA ESPINOZA BLANCO

Jefe Sección de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical
UNMSM

SOLICITUD: PERMISO PARA PODER DISPONER DE LOS SUEROS
GUARDADOS EN LA SEROTECA DE LA SECCIÓN
CIENTÍFICA DEL INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL.

Presente:

Tengo el agrado de dirigirme a usted para expresarle un saludo cordial y a la vez solicitarle el permiso correspondiente para disponer de los sueros de la seroteca que presenten infección con Toxocariosis, infección con otras parasitosis y sueros supuestamente sanos para el trabajo de tesis: "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana" el cual será realizado en el laboratorio de la sección Científica de parasitología del Instituto de Medicina Tropical en el año 2018.

Por su favorable atención, reciba mi agradecimiento.

Atentamente

Rojas Arca, Roberto Antonio

ANEXOS

ANEXO N° 09: Respuesta para el uso de los sueros en estudio



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad de Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DANIEL A. CARRION



Lima, 03 de Agosto del 2018


Sr.
ROBERTO ROJAS ARCA
Alumno de Tecnología Médica
U.N.M.S.M.

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a Usted para saludarlo muy cordialmente y en mi calidad de Jefe de Sección de Parasitología del I. M. T. "D. A. Carrión" autorizo la utilización de los sueros de la seroteca que presenten infección con Toxocariosis, infección con otras parasitosis y sueros supuestamente sanos para el trabajo de tesis: "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana" a realizarse en la Sección Científica de Parasitología del I. M. T. en el año 2018.

Atentamente



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DANIEL A. CARRION


Bigo. Irma Espinoza Blanco
Bigo. Yrmya Espinoza Blanco

Jefe de la Sección de Parasitología
I.M.T. D.A. Carrión

ANEXOS

ANEXO N° 10: Constancia sobre los trabajos donde se han utilizados los sueros, pasando por un comité de ética, validando los sueros empleados en este trabajo.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
"INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "DANIEL A. CARRIÓN"


La que suscribe Directora del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, expide la presente.

CONSTANCIA


Que el Sr. **ROBERTO ROJAS ARCA** alumno de la E.P Tecnología Médica, área de Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina ha realizado su tesis en la Sección de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión, trabajo titulado: **DETECCION DE ANTICUERPOS IgE EN LA TOXOCARIASIS MEDIANTE LA ESTANDARIZACION DE UNA PRUEBA DOT-ELISA** utilizando para realizar su proyecto sueros reactivos y no reactivos de **Toxocara** de la seroteca de la Sección de trabajos de Investigación realizados desde el año 2000 cuyos resultados están publicados en congresos nacionales y extranjeros y en revistas internacionales como: *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* y nacionales como *Anales de la Facultad de Medicina, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Acta médica Peruana, Revista Investigación veterinaria del Perú*

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

En Lima, a los cinco días del mes de junio del dos mil diecinueve.



Jose Vilma R. Béjar Castillo
Directora
Instituto de Medicina Tropical
"Daniel A. Carrión"
Facultad de Medicina, UNMSM



P.D. se adjunta relación de las publicaciones

Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión": José Santos Chocano 199 Urb. San Joaquín,
Bellavista - Callao Teléfono: 6197000 Anexos: 4401 - 4402 - 4404

ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
"INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "DANIEL A. CARRION"



PUBLICACIONES

1. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariosis humana.. AUTORES Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Roxana Suárez, Victoria Chávez, Carlos Sevilla, Elizabeth Dávila, Alina Huiza, César Náquira, Pilar Alva. Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM. 63: 22, 2002
2. Toxocariosis humana y su correlación clínica en Lima (Reporte preliminar). AUTORES Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Carlos Sevilla, Alina Huiza, César Náquira. Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM. 63: 40, 2002.
3. Seroprevalencia de Toxocariosis humana en la población de Lima mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). AUTORES: Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Susana Jiménez. Anales de la Facultad de Medicina. 64(3): 42, Suplemento 2003. ISSN 1025-5583.
4. Toxocariosis en pacientes de hospitales de Lima con lesión ocular confirmados mediante ELISA. AUTORES: Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Susana Jiménez. Anales de la Facultad de Medicina. 64(3): 42, Suplemento 2003. ISSN 1025-5583.
5. Toxocariosis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA Anales de la Facultad de Medicina. 64(4): 228-232, 2003. ISSN 1025-5583. AUTORES: Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Carlos Sevilla, Alina Huiza, Susana Jiménez, César Náquira.
6. Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. AUTORES: Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Carlos Ayllón, Carlos Sevilla, Alina Huiza, Susana Jiménez. Anales de la Facultad de Medicina. 64(4): 247-251, 2003. ISSN 1025-5583.
7. Estandarización de un dot ELISA para el serodiagnóstico de la Toxocariosis Humana. AUTORES: Anales de la Facultad de Medicina. 2004 Vo. 65 pag. 20 ISSN 1025-5583
8. Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Toxocariosis humana en Asentamientos Humanos de Lima, mediante la Técnica de ELISA, 2003. AUTORES: Yrma Espinoza, Pedro Huapaya, Carlos Sevilla, Alina Huiza y Susana Jiménez Anales de la Facultad de Medicina. 65: 38, Suplemento 2004. ISSN 1025-5583.
9. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard elisa for the immunodiagnosis of human toxocariasis AUTORES: William Roldán; William Cornejo; Yrma Espinoza. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.101 No.1 Rio de Janeiro Feb. 2006
10. Prevalencia de anticuerpos IgG anti-toxocara, en pobladores del distrito de perene, departamento de junin. AUTORES: Yrma Espinoza, William Roldán, Pedro Huapaya, Alina Huiza, Susana Jimenez, Carlos Sevilla. v Jornadas Científicas San Fernandinas VIII Jornadas de Investigación de Salud. XV Jornadas Científicas San Fernandinas Estudiantiles. Setiembre 2006. Vol 67 Suplemento 1. ISSN 1025-5583 ISSN 1609-9419
11. "Seroprevalence Of Toxocariasis In Schoolchildren In San Juan De Lurigancho, Lima, Peru" AUTORES: Breña JP; Maguñá C; Huayanay L; Hernández R; Espinoza Y; Roldán W 56th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene.2007
12. Clinical And Serological Evidence Of Toxocara Infection In School Children From Morrope District, Lambayeque, Peru. AUTORES: Yrma A Espinoza, Pedro H Huapaya, William H Roldán, Susana Jiménez, Zhandra Arce, Elmer Lopez. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2008; 50 (2): 101-105.
13. Frequency Of Eosinophilia And Risk Factors And Their Association With Toxocara Infection In Schoolchildren During A Health Survey In The North Of Lima, Peru. AUTORES: William H Roldán, Yrma A Espinoza, Arturo Atúnkar, Emperatriz Ortega, América Martínez, Melissa Saravia. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2008; 50 (5): 273-278.
14. Evaluation Of An Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Test For The Confirmatory Serodiagnosis Of Human Toxocariasis. AUTORES: William H Roldán, Yrma A Espinoza Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009; 104(3): 411-418. ISSN 0074-0276.
15. Seroprevalence Of Human Toxocariasis In Andean Communities From The Northeast Of Lima, Peru. AUTORES: Yrma A Espinoza, Pedro E Huapaya, William H Roldán, Susana Jiménez, Enma P Abanto, Carlos A Rojas, Yuri A Caverro, César A Gutiérrez. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2010; 52(1): 31-36. ISSN 0036-4665.

ANEXOS



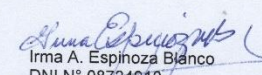
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA
"INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "DANIEL A. CARRIÓN"



16. Toxocariasis: A Seroepidemiological Survey In The Amazonian City Of Yurimaguas, Peru. AUTORES: William H Roldán, Yuri A Cavero, Yrma A Espinoza, Susana Jiménez, César A Gutiérrez. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2010; 52(1): 37-42. ISSN 0036-4665.
17. Toxocariosis Humana: ¿Problema De Salud Pública? Pedro Huapaya H, Yrma Espinoza, William Roldán, Susana Jiménez. ANALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA. 2009; 70(4): 283-290. ISSN 1609-9419.
18. Diagnostico De La Toxocariosis Humana. AUTORES: William H. Roldán, Yrma A. Espinoza, Pedro E. Huapaya, Susana Jiménez. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública año 2010 Volumen 27 Número 4.
19. Toxocariosis Humana en el Perú: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos y de Laboratorio. AUTORES: Judith P. Breña Chávez, Roger Hernández Díaz, Arturo Hernández Peña, Rolando Castañeda Isaias†, Yrma Espinoza Blanco, William Roldán González, Claudia Ramírez Bustamante, Ciro Maguiña Vargas. Acta Méd. Peruana v.28 n.4 Lima oct./dic. 2011.
20. Prevalencia Estimada De Toxocariosis Humana de la Region. AUTORES Lima. Irma Espinoza Blanco, Herman Vildozola Gonzales, Susana Jiménez Ramírez, William Roldan Gonzales, Pedro Huapaya Herreros, Cristian Villar Huamán, Catherine Rojas. Anales De La Facultad De Medicina VOL 77, NUM 1.2016.
21. La Practica Veterinaria Con Caninos Domésticos Como Factor De Riesgo Para La Exposición A Toxocara Canis En Lima, Peru. AUTORES: Lady Anacleto, Néstor Falcón, William Roldan G, Norma Noé M. Yrma Espinoza B REV. INVESTIG. VET. PERU. VOL 26 N° 3 LIMA SET 2015.
22. Anticuerpos Anti-*Toxocara Canis* IgG En Un Centro Médico De San Martin De Porres, Enero A Octubre De 2014. Anales de la Facultad de Medicina. Valdivia Jairo, Espinoza Yrma, Roldan William, Vildózola Herman, Huapaya Pedro y Jiménez Susana Anales de la Facultad de Medicina, U.N.M.S.M. 2016 SUPLEMENTO 1 VOL77 S33.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN SOBRE TOXOCARIOSIS APROBADOS POR EL VICERECTORADO DE INVESTIGACION DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS CON FINANCIAMIENTO

- Estandarización de una prueba de dot-elisa IgE para el serodiagnóstico de la toxocariosis humana. Seroprevalencia de infección por *Toxocara canis* en la provincia de Camaná, departamento de Arequipa.
- Evaluación de un antígeno sintético para el serodiagnóstico de la toxocarosis humana. Determinación de la seroprevalencia de infección humana por *Toxocara canis* en comunidades rurales de la Región Lima.
- Evaluación de los antígenos totales de *Fasciola hepatica* como agente de absorción de anticuerpos inespecíficos en el inmunodiagnóstico de la toxocarosis humana
- Desarrollo de un test de Elisa para la detección de anticuerpo IgG4 para el serodiagnóstico específico de la toxocarosis humana


Irma A. Espinoza Blanco
DNI N° 08724910

ANEXOS

ANEXO N° 11: Instrumento de recolección de datos validado

INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

FORMATO EMPLEADO PARA EL REGISTRO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

INTRODUCCION

El uso de un instrumento de recolección de datos se emplea para el buen registro de los resultados obtenidos durante un trabajo de investigación, para ello, el conocer bien del tema tratado brindara mejoras en los formatos para el ordenamiento de estos valores encontrados. En el presente trabajo nombrado como "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana", se diseña este instrumento de recolección de datos, para registrar de forma ordenada y concisa los resultados obtenidos durante el transcurso del trabajo de investigación. Es un instrumento creado especialmente para el propósito del trabajo, cada casilla se ha diseñado según la importancia de los resultados, conservando la ética en la protección de identidad de los participantes; obteniéndose una formalidad en la presentación de los resultados de la investigación.

OBJETIVO

Registrar de forma ordenada y concisa los resultados obtenidos en el trabajo: "Estandarización de un Dot-ELISA y detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana".

EXPLICACIÓN DEL INSTRUMENTO

El formato empleado se divide en 5 partes, las cuales se clasifican para un mayor entendimiento del instrumento. Los resultados se colocarán según la importancia con la que se quiere dar a conocer en la investigación presentada, para que se pueda leer de forma clara y precisa. Comenzando de arriba hacia abajo se dividen en:

PARTE N°1: Título del instrumento de recolección de datos: Para poder identificar de forma rápida el instrumento de recolección de datos empleado, se prefiere colocar un nombre significativo para su reconocimiento en el trabajo de investigación.

ANEXOS

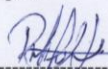
PARTE N°2: Clasificación de los subtítulos: El instrumento empleado consta de 6 casillas nombradas con los subtítulos importantes en el ordenamiento de los resultados de la investigación. Estos subtítulos están en base hacia los valores que se han querido obtener durante el trabajo como son: el número de orden para cada suero analizado, nombre específico de los sueros empleados, una abreviatura para la identificación rápida y clara de los sueros analizados, el número total por cada tipo de suero utilizado, número de sueros positivos para la técnica en estudio y número de sueros negativos para la técnica en estudio.

PARTE N°3: Casillas de relleno I: En estas casillas se colocará los datos según los subtítulos colocados previamente (PARTE N°2). Esta primera parte de las casillas de relleno será empleada para los resultados que formaran parte de la especificidad en la prueba con lo que nos brindándonos una clasificación amigable con el lector. Se ha considerado habilitar 14 casillas (filas) siguiendo la muestra tomada en el trabajo de investigación.

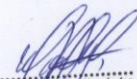
PARTE N°4: Total: Esta clasificación está orientada a identificar el sumatorio general de algunas casillas en la parte N°3 como es: el número total de sueros utilizados, el número de sueros positivos para la técnica y el número de sueros negativos para la técnica, siendo exclusivo de los valores números obtenidos en los resultados.

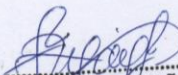
PARTE N°5: Casillas de relleno II: En estas casillas se colocará los datos según los subtítulos en la PARTE N°2. En esta segunda parte de las casillas de relleno está destinada para los resultados que formarán parte de la sensibilidad en la prueba, donde siguiendo la muestra tomada para el trabajo de investigación solo se habilitará una fila, que al ser única para el estudio será considerada como un conteo total en estos valores numéricos obtenidos.

Elaborado por:


ROBERTO ANTONIO ROZAS ARIZA
BACHILLER TECNOLOGIA MEDICA
AREA LABORATORIO CLINICO Y ANATOMIA PATOLOGICA
UNMSM.

Validado por:


Manuel B. Misco Hernández
C.T.M.P. N° 2067
Lab. Clínico y Anat. Pat.



Jenny S. Marique Fong
Tecnólogo Médico
C.T.M.P. N° 5426
Lab. Clínico y Anatomía Patológica

ANEXOS

REPRESENTACION DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

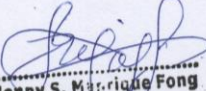
RESULTADOS DOT-ELISA IgE						
	Nº	SUEROS	COD.	Nº SUEROS Total	Nº SUEROS POSITIVOS AL DOT-ELISA IgE	Nº SUEROS NEGATIVOS AL DOT-ELISA IgE
ESPECIFICIDAD						
	TOTAL					
SENSIBILIDAD						

Elaborado por:


 Roberto Antonio Rosas Arce
 Bachiller Tecnológico Médico
 Área Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica
 UNMSM

Validado por:


 Manuel S. Mario Hernández
 C.T.M.P. N° 5067
 Lab. Clínico y Anát. Pat.


 Jenny S. Margarita Fong
 Tecnólogo Médico
 C.T.M.P. N° 5426
 Lab. Clínico y Anatomía Patológica

ANEXOS

ANEXO N° 12: Cuadro de Operacionalización de variables

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DE UN DOT-ELISA Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS HUMANA

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Definición operacional	Tipo de variable	Intervalo de medición	Indicador
Estandarización de un Dot-ELISA	Proceso por el cual se establecen valores apropiados para una prueba en estudio, brindándonos una serie de pasos para su buen funcionamiento.	Sensibilidad	Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo.	Cuantitativa - continua	Número de individuos enfermos	Fórmula
		Especificidad	Es la probabilidad de que un sujeto sano obtenga un resultado negativo en la prueba.	Cuantitativa - continua	Número de individuos sanos	Fórmula
		Valor predictivo positivo	Probabilidad de tener la enfermedad si la prueba resulta positiva.	Cuantitativa - continua	Número de individuos realmente enfermos	Fórmula
		Valor predictivo negativo	Probabilidad de no presentar la enfermedad si la prueba resulta negativa.	Cuantitativa - continua	Número de individuos realmente sanos	Fórmula
Detección de anticuerpos IgE	Es el proceso por el cual se utiliza técnicas específicas para realizar el reconocimiento de los anticuerpos y de esta forma poderlos identificar.	Producción de anticuerpos	Formación de anticuerpos por parte de los órganos importantes en el organismo.	Cuantitativa - continua	Cantidad de anticuerpos generados	Prueba serológica
		Reacción antígeno anticuerpo	Reconocimiento de un antígeno específico con su respectivo anticuerpo.	Cualitativo - nominal	Unión del antígeno y del anticuerpo específico	Prueba serológica
		Pruebas de detección de anticuerpos	Mecanismos usados para hallar los anticuerpos en una muestra.	Cuantitativa - continua	Cantidad de anticuerpos reconocidos	Prueba serológica
Toxocariasis	La Toxocariasis es una infección provocada por las larvas de unas lombrices parasitarias (<i>Toxocara canis</i> y <i>Toxocara cati</i>) que suelen vivir en los intestinos de perros y gatos.	Ciclo evolutivo	Etapas de crecimiento de parásito por distintos cambios en su morfología.	Cualitativo - nominal	Género y especie del parásito	Examen microscópico
		Sintomatología	Serie de sucesos en el organismo que son característica de cierto parámetro de una enfermedad.	Cualitativo - nominal	Signos y síntomas en el organismo	Respuesta corporal
		Tratamiento	Mecanismo para poder detener sucesos malignos ocasionados en el organismo.	Cualitativo - nominal	Respuesta del organismo	Respuesta corporal
		Epidemiología	Parte de la medicina que estudia el desarrollo epidémico y la incidencia de las enfermedades infecciosas en la población	Cualitativo - nominal	Lugar de incidencia epidemiológica	Geografía

ANEXOS

ANEXO N° 13: Matriz de consistencia

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DE UN DOT-ELISA Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGE PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TOXOCARIOSIS HUMANA.

Problema General	Objetivos	Marco teórico	Hipótesis.	Variables e Indicadores	Metodología
<p><i>Principal</i></p> <p>¿Es posible realizar una estandarización de un Dot-ELISA y detectar anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana?</p>	<p><i>Objetivo General</i></p> <p>Estandarizar un Dot-ELISA y detectar anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.</p> <p><i>Objetivos Específicos</i></p> <p>Determinar los parámetros adecuados para la detección eficaz de anticuerpos IgE contra <i>Toxocara</i>.</p> <p>Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba Dot-ELISA IgE.</p> <p>Determinar los valores predictivos positivos y valores predictivos negativos de la prueba Dot-ELISA IgE.</p>	<p><i>Antecedentes</i></p> <p><i>Bases teóricas</i></p> <p>Prueba de Dot-Elisa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Introducción • Historia de la prueba • Metodología de la prueba • Aplicaciones <p>Toxocariosis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Introducción • Agente causal • Ciclo evolutivo • Sintomatología • Pruebas de diagnóstico • Tratamiento • Epidemiología • Medidas de prevención <p>Antígeno de excreción-secreción</p> <ul style="list-style-type: none"> • Introducción • Medios utilizados • Metodología de obtención <p>Anticuerpos circulantes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Generalidades • Estructura del anticuerpo • Clases de anticuerpo <p><i>Definición de términos</i></p>	<p>Se puede establecer la estandarización de un Dot-ELISA y la detección de anticuerpos IgE para el diagnóstico de la Toxocariosis humana.</p>	<p>Variable independiente = Prueba de Dot-ELISA</p> <p>Indicadores: Método estandarizado</p> <p>Variable dependiente = detección de anticuerpos IgE</p> <p>Indicador: Prueba serológica</p>	<p>Tipo de estudio Cualitativo, cuasi-experimental, prospectivo.</p> <p>Diseño metodológico Pasos mediante un protocolo de ejecución para la estandarización</p> <p>Población Sueros almacenados en el Instituto de Medicina Tropical.</p> <p>Muestra Sueros de pacientes con Toxocariosis, pacientes sanos y de otras parasitosis</p> <p>Tipo de muestreo No probabilístico.</p> <p>Tamaño de la muestra 200</p> <p>Unidad de análisis Sueros positivos, negativos y sueros con otras parasitosis.</p> <p>Técnicas Método estandarizado de la prueba Dot-Elisa IgE.</p>